

**A nukleozid-difoszfát kináz NDK-1/NME1 szerepe a membránátrendezési
folyamatokban: hatása a sejtmigrációra és a fagocitózisra**

Doktori értekezés

Farkas Zsolt



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna, akadémikus
Programvezető: Prof. Dr. Vellai Tibor, egyetemi tanár
Témavezető: dr. Vellainé Takács Krisztina, egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Embertani Tanszék
Budapest
2019

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	4
2	Bevezetés	6
3	Irodalmi áttekintés	7
3.1	A daganatok elleni küzdelem	7
3.2	Metasztázis szuppresszor gének	12
3.3	További metastázis szuppresszorok	16
3.4	Az endocitózis folyamata, szerepe a tumorok kialakulásában	17
3.5	Az NME fehérjecsalád	24
3.6	NME-k szerepe a metastázisban	28
3.7	NME-k szerepe a membránátrendezési folyamatokban, kapcsolatuk a Dynaminokkal	31
3.8	Az AWD dózisfüggő hatása <i>Drosophila melanogaster</i> -ben	35
3.9	A <i>Caenorhabditis elegans</i> modellorganizmus bemutatása	37
3.10	A <i>Caenorhabditis elegans</i> mint tumormodell	40
3.11	A disztális csúcsi sejtek (DTC-k) migrációja <i>C. elegans</i> -ban	42
3.12	Az apoptotikus sejtek bekebelezése	46
4	Előzmények	53
5	Célkitűzések	60
6	Anyagok és Módszerek	62
6.1	Felhasznált sejtek, sejtvonalak:	62
6.2	Törzsfenntartás	62
6.3	Az NDK-1 / DYN-1 kapcsolatának kimutatása ko-immunoprecipitációval	63
6.4	Az NDK-1/DYN-1 kapcsolatának kimutatása immunoprecipitációval és tömegspektrometriával (Zheng Zhou csoportja végezte)	63
6.5	Az NDK-1 / DYN-1 kapcsolatának kimutatása DPLA (Duolink <i>in situ</i> proximity ligation assay) módszerrel	64
6.6	Az NME1 / DYN2 kapcsolatának kimutatása DPLA (Duolink <i>in situ</i> proximity ligation assay) módszerrel (Mathieu Boissan csoportja végezte)	64
6.7	Az NDK-1 / DYN-1 kapcsolatának kimutatása time-lapse mikroszkópiával (Zheng Zhou csoportja végezte)	65
6.8	Emberi vérből izolált, elsődleges monocitákból differenciáltatott makrofágok (hMDM) létrehozása (Mathieu Boissan és Florence Niedergang csoportja végezte)	65
6.9	Egér csontvelőből differenciáltatott makrofágok (BMDM) létrehozása (Szondy Zsuzsa csoportja végezte)	66
6.10	<i>In vitro</i> fagocitózis assay vizsgálat hMDM-ken (Florence Niedergang csoportja végezte)	66

6.11	<i>In vitro</i> fagocitózis assay vizsgálat BMDM-ken (Szondy Zsuzsa csoportja végezte)	67
6.12	siRNS transzfekció az elsődleges makrofágokba (Florence Niedergang és Szondy Zsuzsa csoportjai végezték)	67
6.13	NME1, NME2 és NDK-1 túltermelése humán makrofág sejtvonalakban (Orbán Tamás laborjában, Sándor Sára és Hupcsik Kornélia segítségével végeztem)	68
6.14	DTC migráció dóziszfüggésének vizsgálata	68
6.14.1	ndk-1 heterozigóták előállítása	68
6.14.2	ndk-1-et túltermelő törzs létrehozása	69
6.14.3	Transzgenikus <i>C. elegans</i> törzsek előállítása Co-bombardment-tel	69
6.14.4	A DTC migráció vizsgálata	70
6.15	Kritikus His ¹¹⁸ funkciójának monitorozása	70
6.15.1	A mosSCI módszer	71
6.15.2	Genetikai keresztezés	72
6.16	Az NDK-1 interakciós partnereinek azonosítása	73
6.17	A klónozásokhoz alkalmazott PCR reakciók körülményei	74
6.18	Statisztika	74
7	Eredmények	75
7.1	Az NDK-1 DTC migrációra kifejtett dóziszfüggő hatása	75
7.2	Az NDK-1 és NME1 szükséges az apoptotikus bekebelezéshez, és a fagocitózishoz, mely hatást a DYN-1 / dynamin-on keresztül fejtik ki	77
7.3	Az NDK-1 és DYN-1 fehérjék fizikai interakciójának kimutatása <i>C. elegans</i> -ban	78
7.4	Az NDK-1 és a DYN-1 egyaránt jelen van a korai fagoszómák felszínén (kollaboráció Zheng Zhou csoportjával)	80
7.5	Egér csontvelői makrofágokban (bone marrow derived macrophages: BMDM) az NM23-M1/NME1-nek szerepe van az apoptotikus sejtek bekebelezésében (kollaboráció Szondy Zsuzsa csoportjával, Debreceni Egyetem)	81
7.6	Az NME1 funkciója humán makrofágokban nélkülözhetetlen a fagoszóma kialakulásához (együttműködés Mathieu Boissan és Florence Niedergang csoportjaival, INSERM, Paris, Franciaország)	83
7.7	NME1, NME2 és NDK-1 túltermelése humán makrofág sejtvonalakban	84
7.8	Az NDK-1 kölcsönható (fehérje)partnereinek azonosítása	86
8	Diszkusszió	87
9	Összefoglalás	96
10	Summary	97
11	Köszönetnyilvánítás	98
12	Irodalomjegyzék	99

1 Rövidítések jegyzéke

ARF	ADP ribozilációs faktor
ATP	adenozin trifoszfát
AWD	abnormal wing discs
BMDM	bone marrow–derived macrophage (egér csontvelőből differenciáltatott makrofág)
CED	cell death abnormality
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CCP	klatrinnal borított lefűződések
DIC	differential interference contrast
DNS	dezoxiribonukleinsav
DPLA	Duolink proximity ligation assay
DTC	distal tip cell (disztális csúcsi sejt)
DYN-1	dynamin
E-cadherin	epiteliális cadherin
ECM	extracelluláris mátrix
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor) / epidermális növekedési faktor
EMT	epiteliális-mezenchimális tranzíció
EPP	epiteliális polaritás program
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
F1	filial generation 1 (első utódnemzedék)
FGF(R)	fibroblaszt növekedési faktor (receptor)
GAP	<u>G</u> TPase <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein
GEF	<u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor
GTP	guanozin trifoszfát
hMDM	human monocyte–derived macrophages (humán monocitákból differenciáltatott makrofágok)
His	hisztidin
ina-1	INtegrin Alpha
IP	immunoprecipitáció
Kai1	kang ai („rákellenes” Kínaiul)
L1-L4	<i>C. elegans</i> egyedfejlődés lárvastádiumai

lncRNA	Long Non-Coding RNA (hosszú nemkódoló RNS)
MIG	abnormal cell migration
MKK4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
miRNS	mikro-RNS
MMP	mátrix metalloproteáz
MOM-5	more of MS 5
mos1	mosaic element 1
mosSCI	<i>mos1</i> -mediated Single Copy Insertion
MSG	metasztázis szuppresszor gén
MSF	metasztázis szuppresszor fehérje
MVB	multivezikuláris test
NDK-1	nukleozid-difoszfát kináz 1
NDPK	nukleozid-difoszfát kináz
NM23	non-metastatic clone 23
NM23-M	NM23-mouse (egér)
NME	expressed in non-metastatic cell
NTP	nukleozid trifoszfát
OPA1	Optic atrophy 1
ORF	open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF(R)	platelet-derived growth factor (receptor)
PS	foszfatidilszerin
PVL	protruding vulva
RAB	GTP-binding proteins related to Ras proteins
RNS	ribonukleinsav
RNSi	RNS interferencia
Shi	Shibire
UNC	uncoordinated
VEGF(R)	vascular endothelial growth factor (receptor)
VPS-34	Vacuolar Protein Sorting
YK	Yuji Kohara (cDNS könyvtár)

2 Bevezetés

Manapság a rákos megbetegedések, ezeken belül is az áttétek, vagyis a metasztázisok (és nem az elsődleges tumor) szerepe jelentős a megbetegedésekhez köthető elhalálozásokban. Ezért társadalmilag is jelentős a metasztázis folyamatának alapos megismerése.

A humán NM23/NME géncsalád tagjai nukleozid-difoszfát kinázokat (NDPK) kódolnak, melyek evolúciósan konzerváltak, az élővilág minden doménjében képviselik magukat, továbbá számos kulcsfontosságú folyamatban szerepet játszanak, mint a sejtosztódás, sejt migráció, differenciálódás és a szignalizációs útvonalak befolyásolása. Eleinte háztartási génekként kezelték őket, mivel ATP (adenozin trifoszfát) költségére képesek bármilyen NTP (nukleozid trifoszfát) előállítására. Emellett fehérje kináz aktivitással is rendelkeznek, azaz fehérjéket is képesek foszforilálni, mely a jelátviteli folyamatokban fontos tényező. Az intenzív kutatások ellenére a biokémiai funkcióikról még hiányos a tudásunk. A fehérjecsalád fejlődésbiológiai fontosságán túl nem elhanyagolható tényező, hogy az NME1 volt az elsőként azonosított metasztázis inhibitor fehérje (ma már nagyságrendileg 30-at számlálunk). A metasztázis inhibitorok az áttétképződés bizonyos szakaszaiban játszanak szerepet, a metasztázist gátolják, míg a primer tumorok kialakulására nincsenek hatással. Az NME funkcióit fonálféreg genetikai modellrendszeren illetve sejt vonalakon vizsgáljuk, hogy jobban megértsük az emberi szervezetben általuk befolyásolt folyamatokat, illetve esetleges új funkciókat társíthassunk az NDPK-khoz. A fonálféreg nagy előnye, hogy az emberben fellelhető négy, redundánsan működő NME paralógnak egy közös *C. elegans* megfelelője van, az NDK-1.

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy az NDK-1 is befolyásolja a sejt vándorlást, illetve csoportunk új biológiai folyamatban azonosította a géncsalád szerepét; a programozott sejthalállal elpusztult sejtek eltávolítását segíti. Mindkét folyamat kulcsfontosságú lehet az áttétképződés megakadályozásában, melyek háttérében zajló mechanizmusok feltárásakor az NDK-1 és DYN-1 / dynamin fehérje (mely egy kulcsfehérjéje a membránátrendezési folyamatoknak) közötti kapcsolat kulcsfontosságúnak bizonyult. Ezek mellett arra is keressük a választ, hogy bizonyos biológiai funkcióinak ellátását mennyire befolyásolja az NDPK-k megfelelő dózisa, mivel áttétképzéskor csökken az NME1 mennyisége a tumoros sejtekben, illetve egyes modellorganizmusokban ismertek olyan sejt típusok, melyek migrációjához szükséges az NDPK dózisének megváltozása.

Összességében fő célunk az NME1 és NDK-1 biológiai funkcióinak jobb megértése, így közelítve a metasztázis gátlásban betöltött funkciójának megismeréséhez.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A daganatok elleni küzdelem

Világviszonylatban az egyik legfőbb betegséghez köthető elhalálozást a daganatok számlájára írhatjuk, melyek évente 8 millió áldozat haláláért felelősek, és mintegy 14 millió újonnan diagnosztizált esetet írnak le (Stewart, 2014).

A „daganat” szó manapság több mint száz különböző betegséget foglal magába. Az élettudományok szinte minden területe nagyban hozzájárult a tumorsejtek viselkedésének megértéséhez, ezzel megnyitva az utat a daganatok elleni küzdelemhez, így ma már elmondható, hogy évről-évre nő a daganatos túlélők száma (DeSantis és mtsai., 2014).

A fejlettebb országokban, mint például az Egyesült Államokban valamelyest javultak a statisztikák a '70-es évekhez képest; a kimutatásaikból az látszik, hogy ugyan nőtt a diagnosztizált esetek száma, de egyben arányaiban kevesebben hunynak el daganatos megbetegedés következtében. Biztató, hogy bizonyos tumoroknál mára már közel 100%-os az 5 éves túlélési esély (pl. prosztaták), de más esetekben ez az arány még ma is nagyon alacsony: például a hasnyálmirigy- (8%), máj- (17%), vagy tüdőrák (18%) esetében. Az összes rákos megbetegedés összesített ötéves túlélési aránya 50,3 százalékról 67 százalékra nőtt a '70-es évektől napjainkig (Ritchie, 2019). Ennek a háttérben egyrészt a megelőzési programok állnak, melyeknek köszönhetően többen mennek el szűrővizsgálatokra, így korábbi stádiumban tetten érhető az elváltozás, illetve emellett javult a terápiás kezelések hatékonysága is.

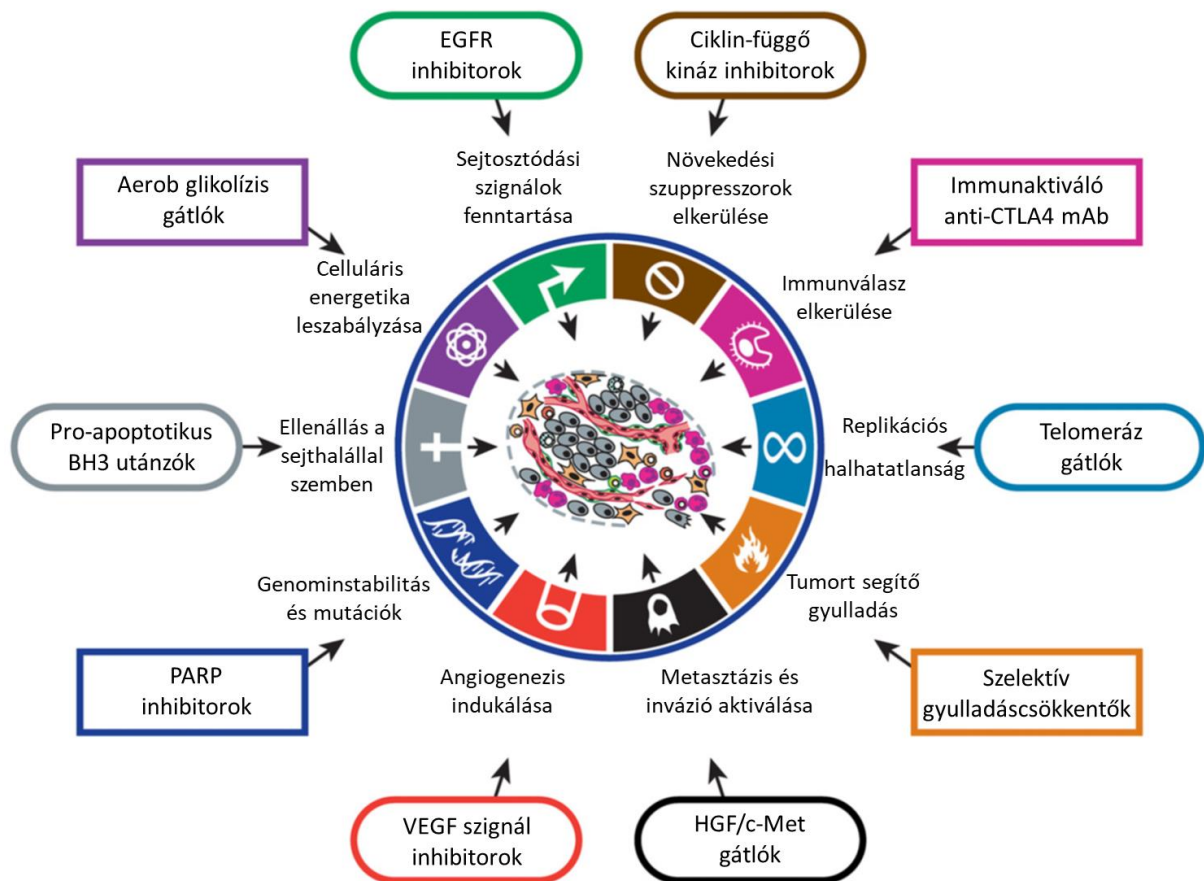
Mindezek ellenére a daganatos betegségek eliminálásától még messze vagyunk, a rossz prognózisú tumorok mellett a legnagyobb gondot az áttétek, azaz a metasztázisok okozzák. Ugyanis legfőképp a metasztázisok az okai a daganatok által kiváltott elhalálozásoknak: 90%-ukért a metasztázisok felelősek (Chaffer és Weinberg, 2011), és ez az arány alig változott az elmúlt 50 évben az intenzív kutatások ellenére (Sporn, 1996).

A metasztatikus sejtek az elsődleges tumorokból kiszakadva keletkeznek, a keringési rendszert kihasználva terjednek, majd egy másik szervben megtelepedve osztódásnak indulnak, létrehozva az áttétet. Ha a daganatot időben sikerül diagnosztizálni, mielőtt még szétterjedhetne, különféle beavatkozásokkal (pl. műtéti eltávolítás, helyi besugárzás) kezelhető, de ha csak később, már áttétes állapotban derül fény a betegségre, akkor a túlélési esély nagyon sok esetben már alacsony lesz. Összességében elmondható, hogy a metasztázisok jelentik a legnagyobb akadályt a daganatokkal szembeni sikeres küzdelemben (Bacac és Stamenkovic, 2008).

A daganatsejtek megjelenésükön túl a rendellenes szabályozásukban térnek el az egészséges sejtektől. Kialakulásukkor a sejt több fő funkciója sérül: egyrészt a differenciálódási képességük módosul: megrekedhetnek egy bizonyos stádiumban, vagy új abnormális sejttípus alakulhat ki, másrészt genomjuk instabillá válik, így az egészséges sejtektől eltérő, számos új, a túlélésüket segítő tulajdonságot szereznek: megváltozik a proliferációs képességük (korlátlan sejtosztódás, illetve halhatatlanság), kiküszöbölik mind a sejthalált és a sejtnövekedés gátlását. Ezek mellett elkerülik az immunrendszert, biztosítják saját tápanyag és vérellátásukat (angiogenezis), invazív képességre tesznek szert, a megváltozott mikroköznyezethez igazítják anyagcseréjüket / metabolizmusukat, illetve fejlődésüket elősegítő folyamatokat is (pl. gyulladás) indukálnak (1. ábra).

A sejtek megfelelő ütemű osztódását növekedési faktorok szabályozzák. Tumoros elváltozás esetén a benne kialakuló mutációk következtében egy adott sejt képes lesz bizonyos növekedési faktort/faktorokat és az annak megfelelő receptort/receptorait is termelni, ezzel fenntartva az állandó proliferációt (autokrin szabályozás). Az ilyen állapot megléte indikátora lehet a malignus transzformációnak (Nagy és mtsai., 2011), mely bonyolult, egymásra épülő lépésekből álló folyamat (Hanahan és Weinberg, 2011).

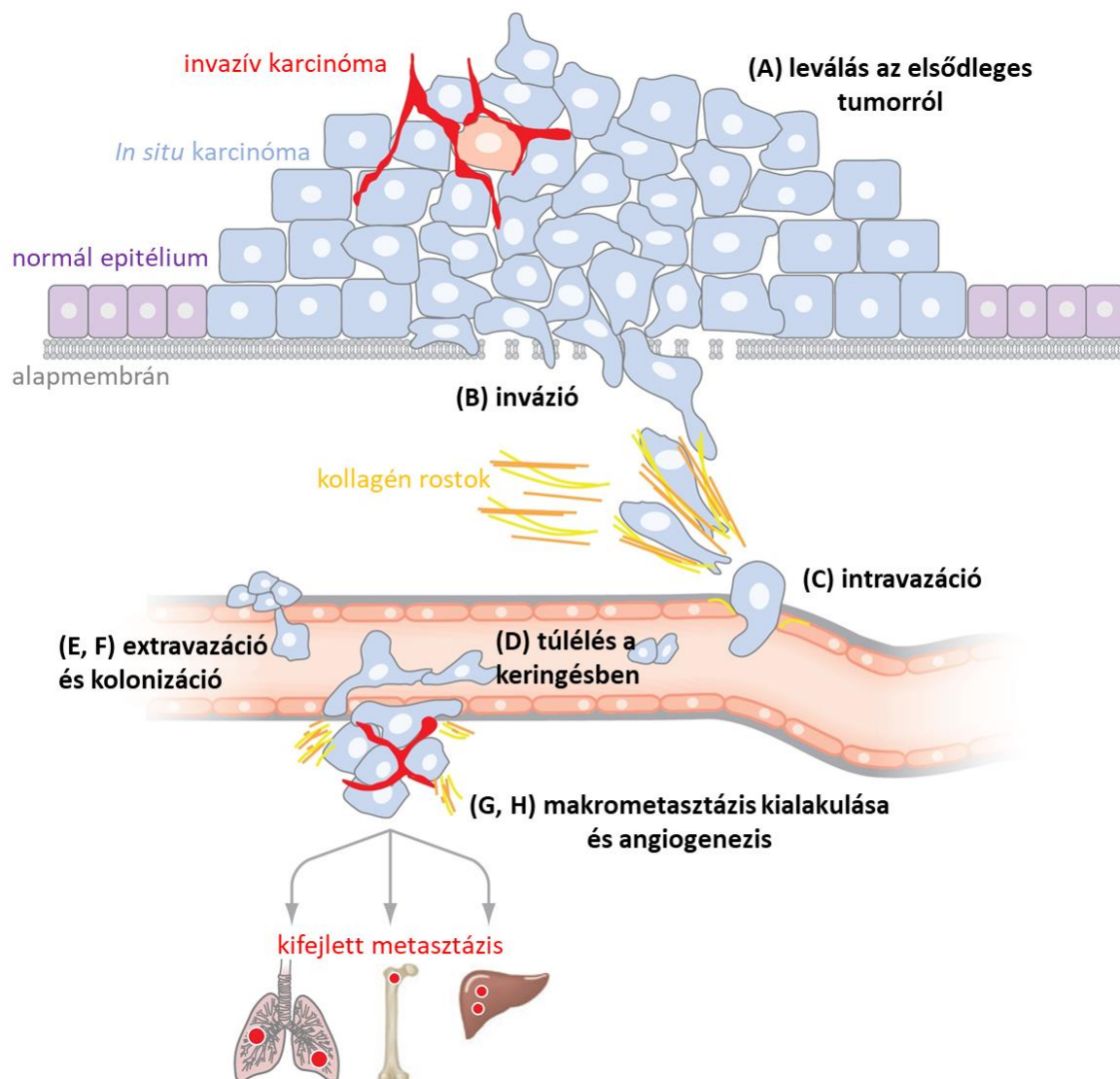
A fenti jellemzők mindegyike potenciális terápiás célpont (1. ábra), melyek kidolgozása során többféle megközelítést alkalmaznak. Talán a legfontosabb, hogy a tumort minél előbb azonosítsuk (tumormarkerek alkalmazása), mielőtt még elfajul, de legfőképp, mielőtt áttétet képezne. Amint az később bemutatásra kerül, az egyik ilyen korai beavatkozási lehetőség a megfelelő sejtpolaritás fenntartása, mivel nagyon valószínű, hogy ez a folyamat az utolsó fék, ami visszatartja a megváltozott sejtet a tumorigenezis útján. De fontos a későbbi folyamatok megismerése is, mivel egyrészt szintén ígéretes célpontok (ld. a következőkben), másrészt a páciensek is különböző stádiumokban kerülnek szakértő kezek közé.



1. ábra. A tumorsejtek kezelésének potenciális gyógyszer-célpontjai (Hanahan és mtsai., 2011 nyomán). A daganat ellen számos beavatkozási pontra terveztek/terveznek, vagy keresnek hatóanyagokat. Ezek a lehetséges pontok a tumor azon szerzett tulajdonságainak egyikénél hatnak, melyek elősegítenek annak fejlődését. A számos ígéretes potenciális gyógyszer-molekula csak a megfelelő klinikai eredményességük bizonyítása után kerülhet engedélyeztetésre, majd kerül használatba a kezelésekkor.

Az áttét- vagyis a metasztázisképzés a malignus transzformációhoz hasonlóan egy komplex, többlépéses folyamat, amelyet karcinómák esetében ismerünk a legjobban (2. ábra), és az alábbi fő stádiumokra oszthatjuk: (A) a tumorsejt leválik az elsődleges tumorról; (B) áttöri az alapmembránt, hogy a környező kötőszövetbe hatoljon; (C) innen a nyirok – vagy vérkeringésbe lép (intravazáció); (D) túl kell élnie a keringési rendszerben, elkerülve az immunrendszer elemeit, majd egy tetszőleges helyen megtapad az érfalon; (E) elhagyja a keringést (extravazáció); (F) majd megtelepedik az új szövetben vagy szervben (kolonizáció), létrehozva a mikrometasztázist; (G, H) adaptálódnia kell az idegen mikrokörnyezethez, osztódni kezd (makrometasztázis), végül biztosítja vérellátását is (angiogenesis) (Bacac és mtsai., 2008; Chaffer és mtsai., 2011; Chambers és mtsai., 2002) (2. ábra). A fenti lépések bármelyikének sérülése esetén nem alakul ki az áttét. Azonban az ezen lépések háttérében álló

molekuláris mechanizmusok nagyon komplexek, és a mai napig erősen hiányos a tudásunk róluk.



2.ábra. A metasztázis főbb lépései (Bacac és mtsai., 2008 nyomán). Az *in situ* karcinómák az epiteliális sejtek transzformációjával keletkeznek. Idővel elveszítik adherens sejtkapcsoló struktúráikat, és kialakul az invazív karcinóma. Mátrix metalloproteázok (MMP) termelésével roncsolják az alapmembránt; a környező kötőszövetbe hatolnak, ahol az extracelluláris mátrix (ECM) lebontása következik, szintén az MMP-k termelésével, melyek leginkább az ECM lebontására „szakosodott” enzimek. Az ECM bontása közben az invazív tumorsejteknek vándorolnia (migrálnia) is kell: képesek megváltoztatni rigiditásukat és alakjukat. Ha eléri az érpályát, belépnek a keringésbe (intravazáció). Idővel a keringést elhagyva (extravazáció) egy távoli szövetben megtelepsznek, de túlélésükért még számos lépést kell tenniük: ki kell fejezniük a lokális szövet növekedési faktor receptorait, hogy osztódni tudjanak, el kell kerülniük a gazdaszövet védelmét, valamint angiogenezist kell indukálniuk a megfelelő tápanyagellátás érdekében. Mindehhez szükséges a metasztázis szuppresszor gének kiiktatása (Tímár, 2004).

Amellett, hogy a legcélszerűbb már az elsődleges tumort eliminálni (mielőtt még áttétet képezhetne), a metasztatikus kaszkád leglassabban lezajló (rate-limiting) lépéseinek azonosítása kulcsfontosságú az alkalmazható terápiák kidolgozásánál, ugyanis a gyógyszer hatásának kifejtéséhez is idő kell, hogy sikeres legyen a kezelés, így kézenfekvő, hogy az eleve lassabban lezajló folyamatokat célozzuk. Több kutatás is abba az irányba mutatott, hogy a metasztatikus kaszkád korai lépései a kritikus, leglassabban lezajlóak, így leginkább az extravazációt megelőzően kell beavatkozni (Orr és Wang, 2001; Zijlstra és mtsai., 2002). Ezek a megfigyelések támogatták azt az elgondolást, hogy a sejtek malignussá válását lehetővé tevő genetikai és epigenetikai változások létrejöttéhez feltehetően hosszabb idő kell. Mostanra számos bizonyíték sugallja, hogy a metasztatikus kaszkádnak nem a kezdeti, hanem épp ellenkezőleg, a végső lépései (a keringésben való túléléstől egészen a kolónia alapításig) a lassúbb lefolyásúak (Valastyan és Weinberg, 2011). Ezt klinikai megfigyelések is alátámasztják; egyrészt számos betegben, akikben az elsődleges tumort azonosítják, már nagyszámban kimutathatóak keringésükből a levált daganatsejtek (Nagrath és mtsai., 2007). Másrészt a már másodlagos régióban megtelepedett tumorsejtek nem minden betegben fejlődnek újabb daganattá, annak ellenére, hogy még kezelést sem kaptak. Maga a metasztázis folyamata sem hatékony (Weiss, 2000). Valójában egyes becslések szerint a keringésbe jutó tumorsejtek kevesebb, mint 0,01%-a fejlődik végül makrometasztázissá (Chambers és mtsai., 2002). Egér modellben keresték először a választ arra a kérdésre, hogy mely szinten/szinteken tűnnek el a tumorsejtek (Luzzi és mtsai., 1998). Az intravénásan bejuttatott melanoma sejtek 80%-a még sikeresen teljesítette az extravazációt, de amint a másodlagos szövetbe kerültek, ott csak kevesebb, mint 3%-uk élt túl, és csupán 0,02%-ukból fejlődött új kolónia (Luzzi és mtsai., 1998).

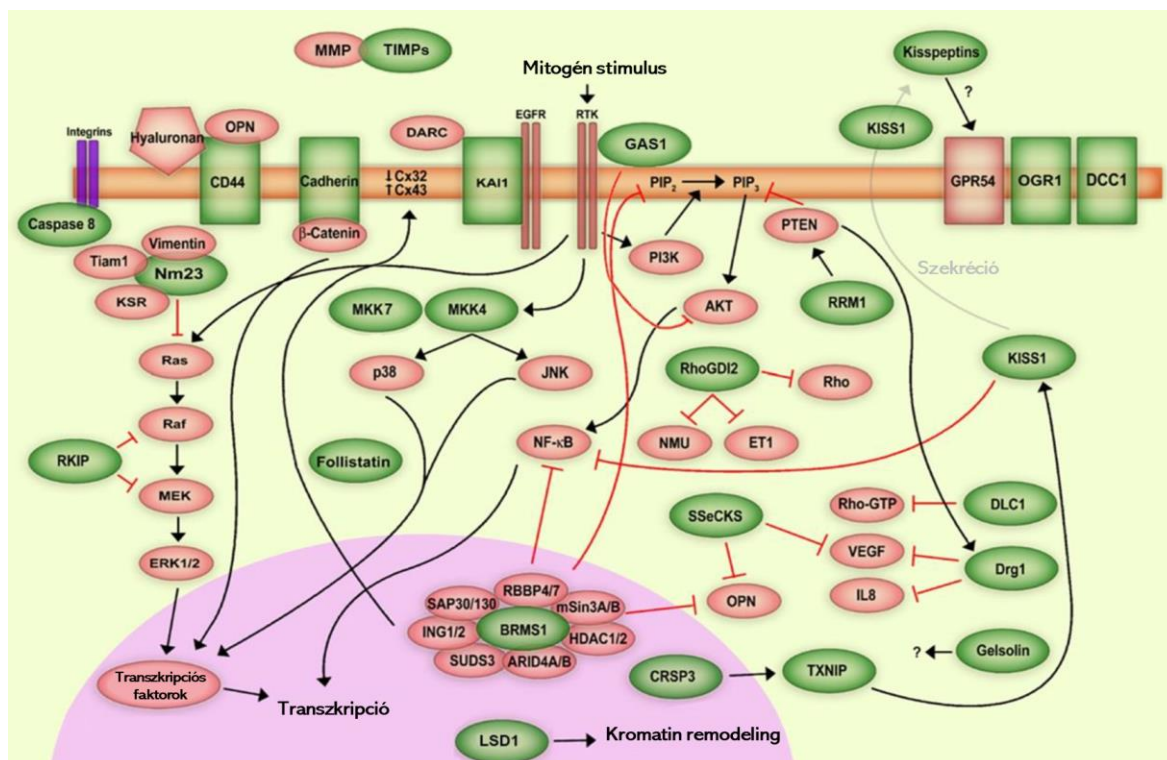
Ennek a megfigyelésnek az alapján ma a daganat sejtek másodlagos régiókban való túlélésére, illetve a metasztatikus kolonizáció mechanizmusára is koncentrálnak a kutatások. Az egyik terápiás lehetőség a mikrometasztázisok nyugvó állapotban tartása, akár egész életen át (Valastyan és Weinberg, 2011). De természetesen a metasztatikus kaszkád bármely lépésének megrekesztése potenciális kezelési célpont lehet (Welch, 2006).

3.2 Metasztázis szuppresszor gének

Az elsődleges tumorsejtek kialakulásához bizonyos gének mutációi, valamint kifejeződésükben bekövetkező változások vezetnek, melyek vagy segítik, vagy blokkolják a sejt tumorsejtté válását. Utóbbiak a tumorszuppresszor gének, melyek sok esetben mutációk következtében inaktívak lesznek, negatívan szabályozzák a sejt osztódását és növekedését (funkcióvesztésük vezet a daganatos elváltozásokhoz), míg velük szemben a tumorok kialakulását segítő proto-onkogének épp ellenkezőleg, pozitív szabályozói ezeknek a folyamatoknak, így funkciónyeréses mutáció esetén válhatnak onkogénekké: expressziójuk megemelkedik, és a tumor növekedését promotálják (Nagy és mtsai., 2011; Weinberg, 2007).

Ugyanezen logika alapján az áttét képzésekor a metasztázis szuppresszor gének (MSG) alul-, míg a metasztázist elősegítő gének felül expresszáltak a nem-metasztatikus daganatokban kimutatható szintjükhöz képest (Yan és mtsai., 2013). Az MSG-k jellegzetes tulajdonsága, hogy úgy gátolják a metasztázis folyamatát, hogy közben nincsenek hatással az elsődleges tumor növekedésére, integritására. A tumorszuppresszorokkal szemben az MSG-k többnyire nem mutációk által, hanem főként epigenetikai módosításokkal (Dong és mtsai., 1996; Fujimoto és mtsai., 1998; Su és mtsai., 2002) például a CpG promoter régiókban a DNS metiláltságának megváltoztatásával, illetve poszt-transzkripcionális vagy poszt-transzlációs módosulások következtében gátlódnak (Kauffman és mtsai., 2003; Steeg, Ouatas és mtsai., 2003). Az MSG-k expressziójának helyreállítása egy ígéretes terápiás megoldás lehet (Iizumi és mtsai., 2008). De fontos megjegyezni, hogy van példa mutációra az MSG-k körében is: például a csoportunk fókuszában álló NM23-H1 (non-metastatic clone 23) S120G mutációja köthető az előrehaladott neuroblasztómához (Chang és mtsai., 1994).

A laboratóriumokban többnyire sejtmodelleken végzett metasztázis vizsgálatok szerint egyik MSG sem képes teljes mértékben gátolni az áttét kialakulását. Már csak azért sem, mert a daganatos sejtek folyamatosan változnak, sokszor a kolóniák sem homogének, és eleve mutációk sorozatának kell bekövetkeznie, hogy a tumor kialakuljon, illetve elinduljon az áttétképzés útján. Ez is alátámasztja azt az elképzelést, hogy maga a metasztázis szuppresszió fenntartása vagy helyreállítása bonyolult folyamat, ami egyszerre több, akár átfedő jelátviteli útvonalat is érinthet, ezért is érdemes a személyre szabott terápiák irányába elmozdulni.



3. ábra. Az ismert MSG-k szerepe a jelátviteli útvonalakban (Stafford és mtsai., 2008 nyomán). Csak azok a főbb jelpályák lettek feltüntetve, melyek a metasztázishoz köthetőek. Az MSG-k (zölddel jelölve) a sejten belüli lokalizációjuk alapján lettek feltüntetve, a hozzájuk asszociált partnerek rózsaszínek.

Az első metasztázis szuppresszor gént, az NM23-H1-et 1988-ban írták le (Steege és mtsai., 1988). Mostanáig körülbelül 30 metasztázis szuppresszort azonosítottak (3. ábra), és továbbiak keresése is folyamatban van. Emellett számos jelölt vár validálásra, melyek közül nem minden potenciális jelölt bizonyult tumorszuppresszornak; például a Tetraspanin szupercsalád tagjai ígéretes jelöltek, mivel jónéhányuknak szerepe van a tumorsejtek migrációjában, angiogenezisében (Detchokul és mtsai., 2014) - ilyen például az ME491/CD63 (Zhijun és mtsai., 2007) -, de nem mindegyikükről bizonyosodott be a metasztázis szuppresszor hatás (W. Liu és mtsai., 2014). A validált metasztázis szuppresszorok nagyban különböznek egymástól; több különböző jelátviteli útvonalban töltnek be szerepet, illetve biokémiai tulajdonságaik is sokrétűek.

Funkciójukat tekintve is igen eltérőek; kezdve az NM23-H1-el, mely hisztidin-kináz aktivitással rendelkezik, sokféle fehérjéhez tud kötődni (ld. NME fehérjecsald c. fejezet), de egészen extrém kötőpartnerei is vannak, ilyenek például az Epstein-Barr vírus fehérjéi (Murakami és mtsai., 2009). Számos MSG sejtfelszíni fehérjéket kódol: a *RECK* (Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) egy sejtfelszíni szerin-proteáz gátlót (a MMP-okat képes gátlani), a *Kai1* (kang ai) pedig egy olyan tetraspanin típusú transzmembrán fehérjét,

mely nyugvó állapotban tartja a tumoros sejteket, az integrinokkal alkotta komplexen keresztül. Emellett a metasztázis későbbi lépéseire, a sejtmigráció és az invázió gátlásához is köthető, a DARC-al (Duffy antigen receptor for chemokines) való kapcsolatának köszönhetően, ami az endotél sejtek transzmembrán fehérjéje. Egy kísérletsorozatban a rákos (prosztata sejtvonal) és endotél sejtek Kail/DARC-on keresztüli kapcsolatát, és annak hatását vizsgálták, és azt találták, hogy fiziológias körülmények között ez a kapcsolat a tumorsejtek növekedését, és kolónia formálását is gátolja (Bandyopadhyay és mtsai., 2006). Ráadásul mindezek mellett a sejtciklus inhibitor p21 (más néven CKI - cyclin-dependent kinase inhibitor) aktivációját is megfigyelték, mely összecseng a nyugvó állapot fenntartásával, bár fontos megjegyezni, hogy ezen sejtek növekedésének leállítása *in vitro* nem bizonyultak reverzibilisnek.

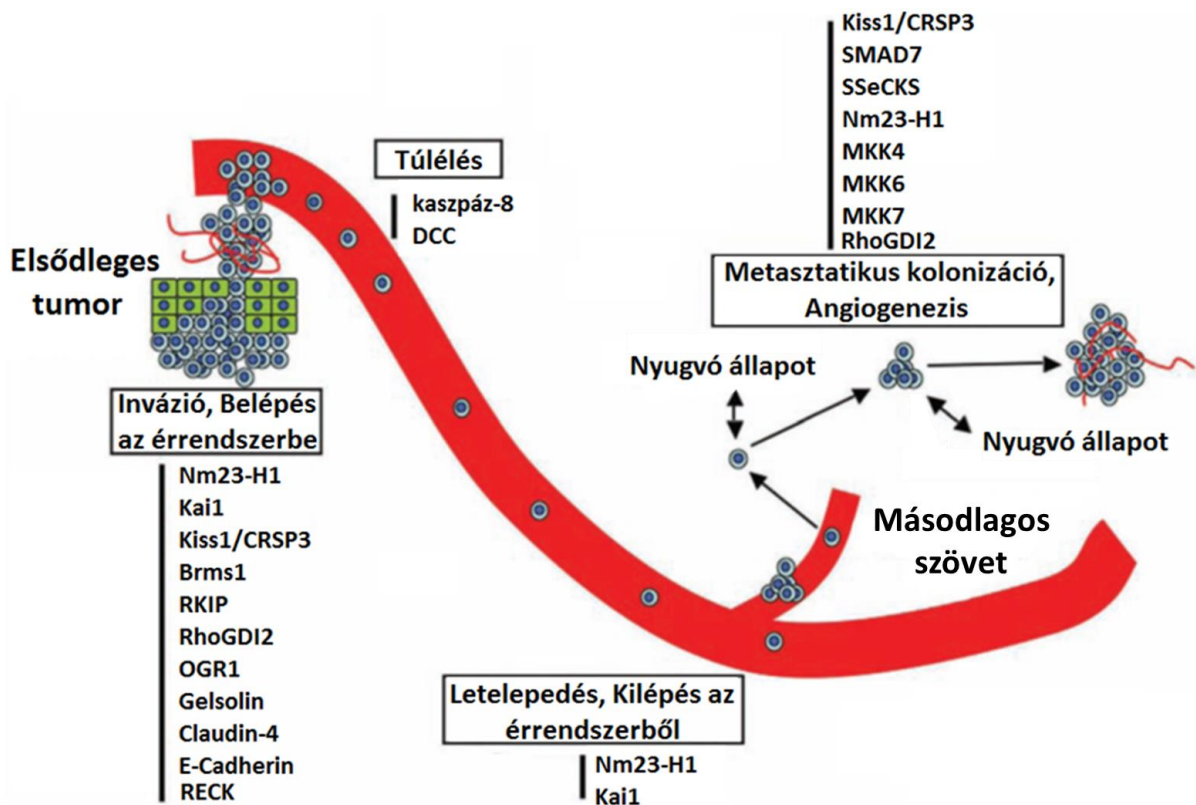
Más MSG-k ligandok: a CTFG (connective tissue growth factor) egy szekretált növekedési faktor, a KISS1 (kisspeptin 1) egy neuroendokrin hatású szekretált peptid. Mindemellett szintén jelentős az MSG-k hatása a jelátviteli folyamatokra: az MKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4) a JNK (c-Jun N-terminal kinase) és a p38 MAPK (P38 mitogen-activated protein kinase) útvonalak aktiválásában is szerephez jut, vele szemben az MKK6 (mitogen-activated protein kinase kinase 6) csak a p38 MAPK-t aktiválja, míg az MKK7 (mitogen-activated protein kinase kinase 7) csak a JNK-t (Christine E Horak és mtsai., 2008). Az MKK4-et érdemes kiemelni, egyrészt, mert több útvonalra is hat, illetve a Kail-hez hasonlóan az áttétek nyugvó állapotban tartásában van szerepe, ráadásul akár átfedő mechanizmuson keresztül. Az MKK4-et kifejező tumorsejtek egerekbe való injektálását követően azok ugyan mikrometasztázisokat még létrehoztak a tüdőben, de nem fejlődtek makrometasztázissá, szemben a csupán kontrollvektorral transzfektált sejteket hordozó egerekkel, melyekben kialakultak az áttétek. Az MKK4 ektopikus expressziója pedig jelentősen meghosszabbította (7-ről 20 napra) az elsődleges tumor műtéti eltávolítását követő túlélést (Vander Griend és mtsai., 2005). Prosztatarákban az MKK4 a JNK útvonalon keresztül hat, melynek aktivációja végül apoptotikus géneket kapcsol be. Az MKK4 kináz aktivitása az elsődleges tumorokban nem, csak metasztázisokban fejti ki hatását. Ezzel szemben petefészekrákban a p38 útvonal aktiválása mellett a D1 ciklint is gátolja, ezzel nyugvó állapotban tartva a tumoros sejteket. Érdekes módon az MKK4 expressziója által kiváltott p38 aktivitás nem vezet sejthalálhoz (Hickson és mtsai., 2006). A sejtciklust gátló hatását egy másik megfigyelés is alátámasztja: a Kail esetében említett p21-et is aktiválja. Ráadásul ez a sejtciklus gátlás az MKK4 esetében *ex vivo* reverzibilisnek bizonyult; a kultúrákban fenntartott tumorsejtek osztódásnak indultak (Lotan és mtsai., 2008). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az MKK4-nek kettős kináz funkciója van, mely két különböző, metasztázist gátló útvonal

aktiválására képes sejttípustól / szövettől függően. Kiemelendő, hogy a Kai1-gyel egyetemben az MKK4 is aktiválja a p21-et, így feltételezhető, hogy egyazon mechanizmuson keresztül fejtik ki hatásukat a metasztatikus sejtek nyugvó állapotban tartásában.

További MSG például a RhoGDI2 (Rho GDP dissociation inhibitor beta), mely a Rho GTPázon keresztül szabályozza a jelátvitelt, az SSeCKS (src-suppressed C-kinase substrate) pedig a protein kináz A és C állványfehérjéje (Christine E Horak és mtsai., 2008). Az ismert MSG-k jelátviteli útvonalakban betöltött szerepe alapján egy részük a MAPK útvonalhoz, mások pedig az apoptózis, sejtkapcsolódás, sejtciklus szabályzás folyamataihoz köthetőek, mely folyamatok szükségesek is a tumorprogresszióhoz (3.ábra) (Shevde és Welch, 2003).

Az egyes MSG-k a metasztatikus kaszkád különböző lépéseit képesek gátolni (4. ábra). Közülük jónéhány már a primer tumorban kifejti hatását a daganatsejtek motilitását gátolva, ezáltal befolyásolva azok inváziós potenciálját. Mások a tumor sejt érfalon való kitapadására és az extravazáció lépéseire hatnak. Továbbiak pedig a kaszkád utolsó stádiumánál jutnak szerephez: a túlélést, a kolonizációt és a növekedést befolyásolják a másodlagos szövetben.

Amellett, hogy az egyes MSG-k sokszor multifunkciósak, fontos leszögezni, hogy hatásuk esetenként kontextusfüggő: vannak olyanok, melyek adott tumorokban kifejtik szuppresszor hatásukat, míg más tumorokban nem teljesen bizonyos a szerepük, illetve előfordulhat az is, hogy egyes daganatokban pont ellenkezőleg hatnak, akár a rossz prognózis jelei is lehetnek. Ilyen fehérje például a mitotikus mesterregulátor Plk1 (polo-like kinase 1) (de Cárcer, 2019). Összességében elmondható, hogy ezek a „kettős ügynökök” általában olyan proto-onkogének, melyek metasztázis szuppresszor funkcióval bírnak (Shen és mtsai., 2018). Ez a felismerés új megvilágításba helyezi a metasztázisok megértését, és figyelembevételével új terápiás megközelítésekre is szükség van.



4. ábra. A metasztázis szuppresszor gének a metasztatikus kaszkád több pontját is képesek gátolni (Horak és mtsai., 2008 alapján). Az ábrán a metasztatikus kaszkád főbb lépéseire rendezve láthatjuk az adott lépésre ható metasztázis szuppresszorokat. Érdekes kiemelni az NM23-H1-et, mivel egyrészt minden migrációval kapcsolatos lépéshez köthető, így a kaszkád számos pontján hat, másrészt, mert a későbbiekben az NM23 fehérjecsaládra fogunk fókuszálni.

3.3 További metasztázis szuppresszorok

Az előzőekben bemutatott, régebb óta kutatott metasztázis szuppresszor gének (MSG) hatásán túl újabb, a metasztázist befolyásoló komponensek, ezáltal potenciális (vagy már validált) szuppresszorok kerültek napvilágra.

Ilyenek az anti-metasztatikus miRNS-ek (mikro-RNS), melyek közül még nem ismerünk sokat, de a metasztázisra gyakorolt hatásuk látványos; például a miR-146 az invázió-migráció folyamatát befolyásolja (Hurst és mtsai., 2009). További ilyen, a DNS-ben kódolt, de fehérjévé nem íródó csoportot a hosszú nem kódoló RNS-ek (lncRNA: Long Non-Coding RNA) alkotják. Az ide tartozó lncRNA LET (lncRNA Low Expression in Tumor) kifejeztetése hepatocelluláris és vastagbél karcinóma sejtekben (SMMC-7721 és HCCLM3) egerekbe juttatva megakadályozta az ezekből képződő metasztatikus sejtek kolonizációját a tüdőben (Yang és mtsai., 2013).

Végül meg kell említenünk a metasztázisra hajlamosító gének csoportját (Metastasis Susceptibility Genes). Fontos kiemelni, hogy mint ahogy bemutatásra került, az MSG-k sokszor nem mutációval, hanem a génexpresszió szabályozás valamely szintjén kerülnek kiiktatásra a tumorprogresszió során. Ezzel szemben a hajlamosító gének bizonyos örökölhető alléljai hozhatóak összefüggésbe a metasztázissal, így ezen allélek megléte már prognosztikus jelentéssel bír (Hunter és mtsai., 2001) (Park és mtsai., 2005). Megismerésük rendkívül fontos, ezért számos genetikai szűrővizsgálattal próbálnak minél több ilyen hajlamosító gént, és azok kritikus alléljait azonosítani (Bai és mtsai., 2016). Ilyen validált tag pl. a Cadm1 (Cell Adhesion Molecule 1): szerepe van a tumorsejtek érzékenyítésében a CD8+ T-sejtek által adott immunválaszra. Ráadásul MSG-ként is viselkedik; overexpressziója gátolja a metasztázist, miközben az elsődleges tumorok növekedésére nincs hatással (Faraji és mtsai., 2012).

Csak említés szintjén érinteném az egyik legújabban kutatott területet, ami a tumorok anyagcsere termékeivel, azaz az onkometabolitokkal foglalkozik. A fentiek során láthattuk, mennyi változáson esik át egy sejt, mire tumorsejtté alakul, ill. mennyi változáson kell átesni a metasztatikus kaszkád teljesítéséhez, ezáltal alkalmazkodva a számos szempontból megváltozott (pl. hipoxiás) környezethez. Ehhez elengedhetetlen az anyagcsere /anyagcsere útvonalak változása, attól függően, hogy milyen körülmények, szubsztrátok állnak rendelkezésre (Teoh és Lunt, 2018; Weber, 2016). Egyre növekvő tudásunkra alapozva akár a tumorsejtek által használt alternatív anyagcsere blokkolásával is fel lehet venni a tumorok és a metasztázisok elleni harcot (Carvalho és mtsai., 2019).

3.4 Az endocitózis folyamata, szerepe a tumorok kialakulásában

Az élő sejteknek (*Prokariótáknak* és *Eukariótáknak* egyaránt) létfontosságúak azok a képességeik, melyekkel érzékelik az extracelluláris környezetet, felvesznek tápanyagot, jeleket érzékelnek és bocsátanak ki (szekréció). Az ezekre ható folyamatok sokszor membránnal határolt kis vezikulák képzésén alapszanak. A vezikulák által a külvilágból felvett és a sejt belseje felé szállított anyagok transzportjának folyamata az endocitózis, melyet sokáig háztartási folyamatként kezeltek: ugyanis csak azt a funkcióját ismerték, amivel az általa felvett tápanyagok a lizoszómákba jutnak, ahol építőköveikre lesznek bontva, ezután a citoszólba kerülnek hasznosítás céljából. Azonban az endocitózis nem korlátozódik kizárólag a tápanyagfelvételre, számos fontos szerepe van még pl. a sejt védekező mechanizmusában (a vírusok is az endocitózist kihasználva jutnak a gazdasejtbe), a vele ellentétes folyamat, az exocitózis következtében megnövekedett sejtfelszín normál szintre való csökkentésében (így a

sejt belsejéből származó membránok visszajuttatásában). Ezek mellett a jelátviteli folyamatokban is érintett (Le Borgne és mtsai., 2005): az endocitózis lehetővé teszi a jelmolekulák felvételét a környező médiumból, illetve a sejtfelszíni receptorok internalizációját; a plazmamembrán receptorainak endocitózisa, és a lizoszómákba küldése az általuk közvetített szignál csökkentéséhez vezet.

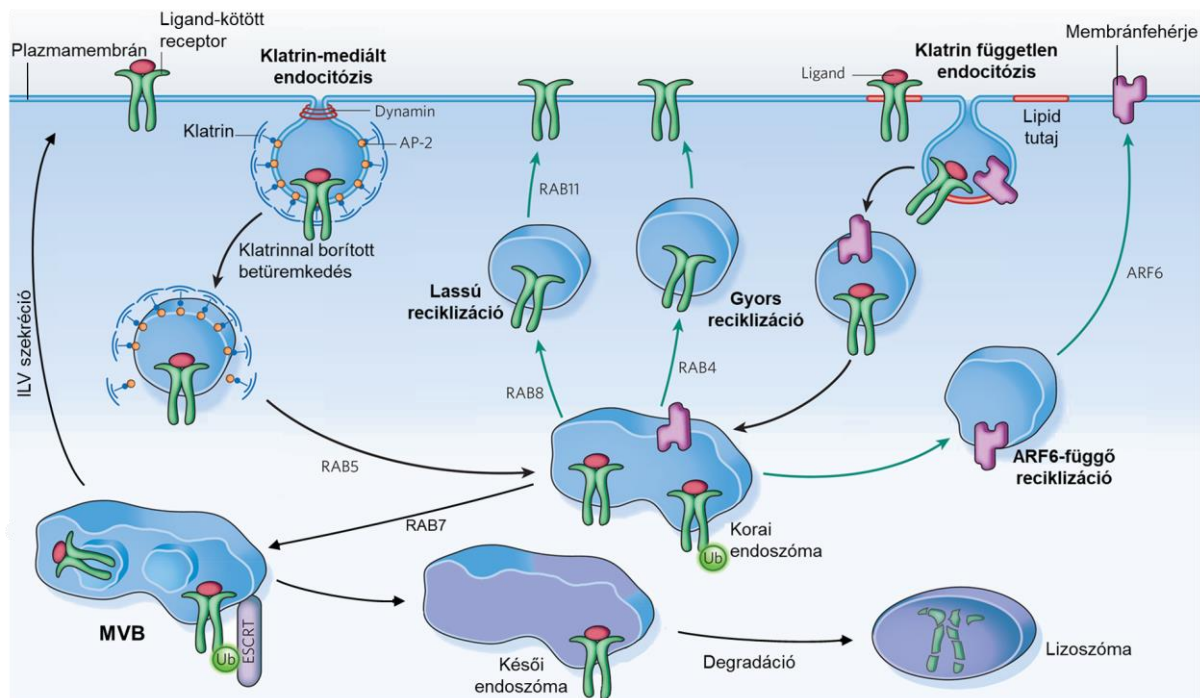
Mindezen túl a plazmamembrán fehérjék normál szinten tartásában is érintett, ezáltal többsejtű szervezetekben fontos a szerepe az epiteliális sejtek integritásának fenntartásában, a polaritásuk kialakításában, illetve a morfogenezis alatti epitélium változások, például az epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT) szabályzásában. Az endocitózis sérülése a tumorok kialakulásával is összefüggésbe hozható; a hozzá köthető egyes gének tumorszuppresszorként is viselkednek (pl. Vps25 - Vacuolar protein-sorting-associated protein 25) (Vaccari és Bilder, 2009).

Az endocitózis szabályozza a vezikulák lefűződését/ kialakulását, mozgását, fúziós eseményeit a plazmamembrántól az intracelluláris kompartmentek felé, miközben a sejt számára fontos molekulákat hordoznak. Számos különböző szállítási útvonal különíthető el (5. ábra), egyrészt aszerint, hogy a vezikulák klatrinnal borítottak-e, másrészt, hogy lefűződésükhöz szükséges-e a nagy GTPáz dynamin, ami a klatrinnal borított vezikulák plazmamembránról való lefűződéséért felel (Sever és mtsai., 2000). A dynamin jellemzését ld. az „NME-k szerepe a membránátrendezési folyamatokban” című fejezetben.

Ezek a szállítási folyamatok finoman szabályozottak, ugyanis az adott molekulák pontos célba juttatása kulcsfontosságú. Az endocitózis folyamatának pontosítása specifikus (adapter) fehérjékkel történik: például különböző membránreceptorok és más plazmamembrán komponensek internalizációjakor a klatrin réteg és a plazmamembrán összekötését segítik, de a későbbi lépésekben is számos fehérje működik közre. Tehát a különböző komponenseket szállító vezikulák már a kezdetekkor különböző jelölést hordoznak. Ezután kezdődik meg az internalizáció folyamata a membrán betűródését segítő komponensek, illetve a dynamin toborzásával.

Az így kialakult vezikulák többsége a korai endoszómákkal fuzionál, melyek kialakulásában és érésében a Syntaxin7 és 12, illetve a Rab5 (Ras-related protein 5) játszik fontos szerepet (Bucci és mtsai., 1992; H. Lu és Bilder, 2005). A nyúlványos megjelenésű, korai endoszómák szortírozó szereppel is bírnak; az ide került molekulák többféleképpen léphetnek tovább (Miaczynska és mtsai., 2004; Vaccari és Bilder, 2009): 1. A róla lefűződő vezikulák a Golgi apparátus felé veszik útjukat. 2. A molekulák több lehetséges úton újrahazsnosításra kerülnek, ilyen például a Rab4 vezérelte gyors újrahazsnosítás, vagy a Rab11 mediált lassú

újrahasznosítás. 3. A vezikulák a késői endoszómába, vagy más néven multivezikuláris testekbe (MVB) transzportálódnak. A késői endoszómák a korai endoszómákból alakulnak ki, amikor már sok olyan molekula halmozódik fel membránjukban (sérült fehérjék, nem szükséges sejtfelszíni receptorok, stb.), mely a lizoszómában való lebontásra ítéltetett. Megjelenésük gömbszerű, a membránjukhoz asszociált Rab7 jellemzi őket (Bucci és mtsai., 2000). A saját maguk által képzett, illetve a korai szortírozó endoszómákból ide küldött, immár intralumináris vezikulák (ILV) felhalmozásával alakulnak MVB-vé (Henne és mtsai., 2011). Ha később az MVB-k a plazmamembránnal fuzionálnak, az az ILV-k szekréciójához vezet (Cocucci és mtsai., 2009). De az MVB-k képesek az érést tekintve előrehaladottabb (és ezáltal savasabb közegű) késői endoszómákkal is fuzionálni (Rink és mtsai., 2005), mely után a lizoszómákban kerülnek lebontásra. Fontos megjegyezni, hogy az endoszóma érése során annak belseje (lumene) egyre inkább elsavasodik, melynek hátterében a V-ATPáz (Vacuolar-type ATPase) protonpumpa funkciója áll; az endoszóma érés során szignifikánsan több jelenik meg a késői endoszóma membránjában (Lafourcade és mtsai., 2008).



5. ábra. Az endocitózis főbb útvonalai (Scita és Di Fiore, 2010 nyomán). Az endocitikus vezikulák képződhetnek klatrin borítástól függően és függetlenül. A sejtfelszíni receptorok internalizációja legtöbbször klatrin-mediáltan történik. A klatrin adapterek segítségével (pl. AP-29) toborzódik a membránhoz, majd itt polimerizálódik. Ezt követi a membrán betüremkedése, majd a dynamin biztosítja a kialakult vezikula lefűződését az intracelluláris térbe. A folyamat egyszerűnek tűnik, de több, mint 50 fehérje összehangolt működése szükséges hozzá. Számos más, klatrintól független úton is képződhetnek vezikulák, melyek bizonyos esetekben „lipid tutajok” (plazmamembrán mikrodomének) segítségével alakulnak ki. Bármilyen úton is képződött a vezikula, az internalizációt követően a korai endoszómákhoz jutnak. Az ideszállított anyagok a korai endoszómából lényegében kétféle választás elé néznek:

a molekulák újrahasznosításra, vagy lebontásra kerülnek. Ez azonban többféleképpen történhet: az endoszómális rendszerben való „közlekedést” a Rab (GTP-binding proteins related to Ras proteins) és ARF (ADP ribozilációs faktor) családok kis GTP (guanozin trifoszfát) kötő fehérjéi kontrollálják. A molekulák újrahasznosításra kerülhetnek azonnal (mely a Rab4 funkciójához kötött), vagy lassabban (Rab8 és Rab11), illetve a klatrintól függetlenül felvett molekulák az ARF6 (ADP-ribosylation factor 6)-függő útvonalon kerülnek vissza a plazmamembránhoz. Azonban a Rab7 által befolyásolt útvonalon a lebontásra ítélt (ubiquitinilált) fehérjék az ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) komplexekkel való interakciójuk következtében végig járják a degradációjukhoz vezető utat: az MVB-n, majd a késői endoszómán át végül a lizoszómába kerülnek, ahol befejeződik a lebontásuk.

Láthatjuk, hogy a különböző típusú endoszómákat, illetve a róluk lefűződő különböző funkciójú kompartmenteket specifikus Rab fehérjék jelölik. A Rab fehérjék a Ras-szerű GTPázok családjába tartoznak, melyek a sejten belüli membrántranszport folyamatok (endo- és exocitózis) összehangolásában játszanak kulcsszerepet (Zerial és McBride, 2001). Számos effektor és szabályzó fehérje hat a Rab-okra, mint például GEF-ek (guanine nucleotide exchange factor) és GAP-ok (GTPase activating protein). Előbbiek nukleotidcserélő segédfehérjék (GDP leválasztásával és új GTP feltöltésével aktiválják az adott GTPázot), míg utóbbiak a GTP-bontást serkentő segédfehérjék, szerepük a GTP hidrolízisének segítésében van.

A további specifikitást az endoszómális szortírozó komplexek (ESCRT) adják, melyek a késői endoszóma ill. az MVB kialakításában játszanak szerepet. Négy ilyen ESCRT komplexet karakterizáltak eddig: 0 (más néven Hrs-Stam komplex), I., II. és III. komplex (Vaccari és mtsai., 2009). Az ESCRT komplexek aktivitásának következtében halmozódhatnak föl az MVB-n belül az ILV-k. Adott fehérje ubiquitináltsága szolgáltatja a szignált az ILV-be kerüléséhez. Ez a jelölés legtöbbször már a plazmamembránon megtörténik, előrevetítve a fehérje sorsát. Az így jelölt, azaz ubiquitinált fehérjék felismerésében az ESCRT-0 komplexnek van szerepe; az endoszóma citoszolikus felszínéhez toborzódik, miután felismerte a lebontandó membránfehérjét az ubiquitin kötő doménjével, ezzel ki is jelöli az ILV kialakulásának helyét. Ezután az ESCRT-0 toborozza az ESCRT-II-t, majd a II a III-at. Ez a két komplex szintén rendelkezik ubiquitin felismerő doménnel, így a membrán felületének meghajlításán túl további ubiquitinált fehérjék koncentráálásában is szerepük van. A vezikula kialakítását és lefűződését az MVB-be az utolsóként idetoborzott ESCRT-III komplex végzi (Vaccari és mtsai., 2009).

Az endocitózisnak tehát számos fiziológias folyamatban jelentős szerepe van. Így könnyű belátni, hogy az endocitózis sérülése kóros folyamatokhoz vezet, mint pl. atherosclerosis, Alzheimer kór (Maxfield, 2014), neuromuszkuláris betegségek (Cowling és

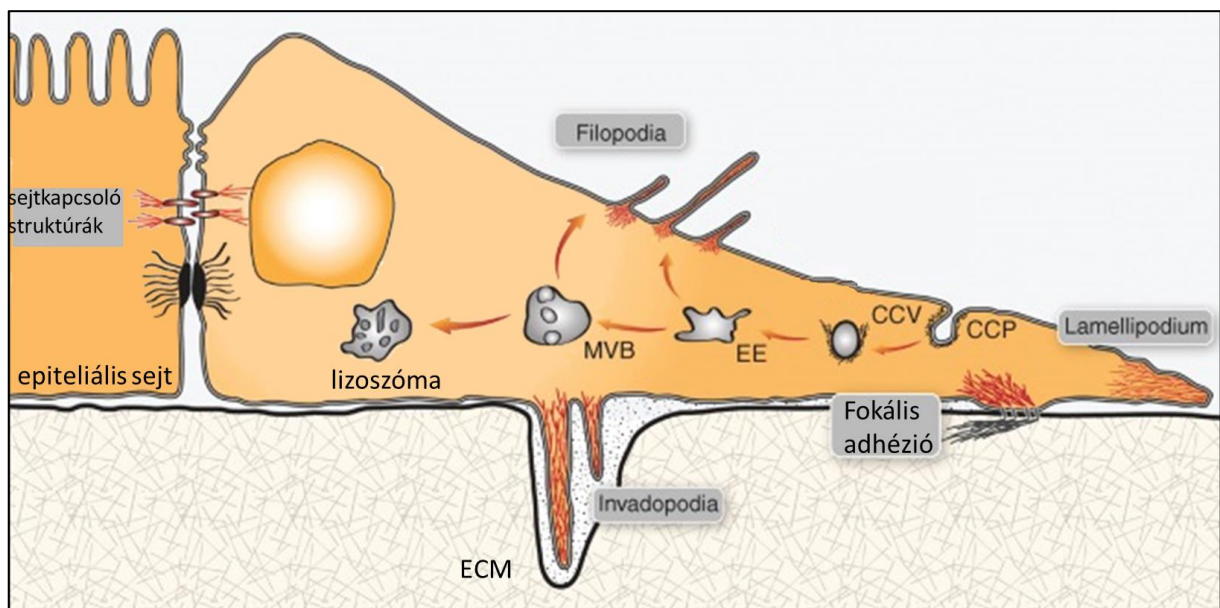
mtsai., 2012), cisztás fibrózis (Jouret és mtsai., 2007), vagy éppen a fókuszunkban szereplő tumorok és áttétek képzése (Joffre és mtsai., 2011; Kawauchi, 2012; Mellman és Yarden, 2013). A daganatos elváltozásokkor bizonyos sejtfelszíni receptorok (pl. receptor tirozin kináz (RTK)) reciklizáció változásának köszönhetően a sejt növekedésére és osztódására ható útvonalak hiperaktiválódnak, emellett az epiteliális sejtek integritásának megváltozása (sejtheadhéziós struktúráik elvesztése) is jelentős folyamat az áttétek képződésekor, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a daganatok jelentős hányada az epitéliumból alakul ki (McCaffrey és Macara, 2011).

Az epitélium feltehetően a legrégebben kialakult szövettípus, mely eleinte a Metazoaak belső közegét különítette el a külső környezettől (Cereijido és mtsai., 2004), mára a test egészét nézve borítja be mind a szervek külső és az erek belső felszínét, mind a belsőszerveken belüli üregek belső felszínét. Az elkülönítő funkción túl fontos szerepet kap a szervezet védelmében, az érzékelésben, a szekrécióban, sejtközzti transzportfolyamatokban és tápanyagok felszívásában. Mára az állati szervezetek komplexitásának következtében több, mint 150féle epiteliális sejtet különböztetünk meg, melyek a legkülönbözőbb szövetek (emésztő-, légző-, reprodukciós-, ideg- és érzékszervek, illetve keringési- és hormonrendszer) kialakításáért és/vagy funkcionalitásáért felelnek, miközben szövet-specifikus őssejtekből folyamatosan megújulnak (Alberts, 2010).

Funkcióiknak ellátására az epiteliális sejtek sajátos tulajdonságokkal bírnak: 1. speciális adhézsiós sejt-kapcsoló struktúrákkal (cadherine) állnak össze egységes felületté; 2. ezek mellett szigetelő struktúrákat is találunk a sejtek között (tight junctions), melyek a külső környezettől való elhatárolást teszik lehetővé; 3. és végül: vektoriális anyagtranszportra (szekréció/felszívás) képesek. Mindezen funkciók betöltése a membrán- és citoplazma polarizáltságából adódik: a transzportfolyamatokat tekintve apikális-bazális irányultsággal rendelkeznek, míg a mellettük lévő sejtekkel való kapcsolatuk a laterális irányultságukból következik. Az epiteliális sejtek további fontos tulajdonsága a plaszticitásuk: elveszíthetik (epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT)), vagy épp ellenkezőleg, visszanyerhetik epiteliális sejt mivoltukat (mezenchimális-epiteliális tranzíció (MET)) (Lim és Thiery, 2012). A különféle polaritású membrán régiókra jellemző (pl. apikális (csillós felszíni), laterális, bazális) domének kifejezését (ezzel az epitélium polarizált/depolarizált állapota közötti váltást), a citoszkeleton átrendezését és a polarizált transzportfolyamatok irányítását egy bonyolult, több sejtszintű folyamatra támaszkodó hálózat összessége, az epiteliális polaritás program (EPP) szabályozza, extracelluláris jelekre reagálva (Rodriguez-Boulan és Macara, 2014).

Az EMT során kemokinek és növekedési faktorokra válaszolva számos sejtszintű folyamat megváltozik, mint például a vezikuláris transzport, vagy a génexpresszió megváltozása, mely új

makromolekulák szintézisével jár. Az EMT alatt az epiteliális sejtek depolarizálódnak, és migrációs/invazív tulajdonságokra szert téve alakulnak mezenchimális sejtekké. Legfőképp az embrionális fejlődéskor érhetjük tetten az EMT-t (pl. mezoderma kialakítása), de szövetregenerálódáskor is fontos tényező. Az EMT-hez hasonló folyamat játszódik le a daganatok rosszindulatúvá válásakor (invázió, áttétképzés) (McCaffrey és mtsai., 2011; Muthuswamy és Xue, 2012), mely során az endocitózis folyamatának változása következtében a sejtnövekedésre és osztódásra ható szignalizációs útvonalak intenzív aktivitásának következtében beindul a tumor növekedése, emellett a vezikuláris transzportfolyamatok aberráns működésének következtében speciális sejtfelszíni struktúrák is kialakulnak (6. ábra).



6. ábra. Epiteliális eredetű tumorsejtek megváltozott felszíne (Mellman és Yarden, 2013 nyomán).

Több, aktinnal kitöltött felszíni struktúra szerepel az ábrán, melyek megjelenése, működése a vezikuláris transzportfolyamatokhoz kötött. A struktúrák építőköveinek turnover is ezen folyamathoz köthető; a klatrinnal borított lefűződés (CCP) endocitózist követően a vezikulák (CCV) tartalma a korai endoszóma (EE) – MVB – lizoszóma tengely mentén kerülnek lebontásra, vagy valamelyik lépés közben újrahasznosításra. A **filopodia**-nak az érzékelésben, a sejtek közötti interakcióban és a sejtmigrációban is jut szerep. Sokszor a migráló sejt haladási iránya felőli pólusán (leading edge) túlnyúlva veszik fel a kemotaktikus jeleket, ezáltal biztosítva az irányított mozgást. A **lamellipodium** biztosítja a leading edge folyamatos előre haladását; itt az intenzív vezikuláris transzport folyamatosan távolítja el (internalizálja) a távolabbi sejtfelszínekről az integrineket és az RTK-kat, melyek irányítottan a lamellipodiumnál kerülnek újrafelhasználásra. Az integrinek (többnyire a $\beta 1$) adják a sejt és az alatta lévő extracelluláris mátrix közötti szoros, mégis dinamikus kapcsolatot (**fokális adhézió**). Ennek szabályzásában szintén az endoszómális szortírozásnak jut fontos szerep, ugyanis az integrin újrahasznosítás intenzitása határozza meg a sejtmigráció sebességét. A szintén ventrálisan elhelyezkedő **invadopodia**-k az invázió során roncsolják (perforálják) az ECM-ot.

Az endocitózis kontrollálja a sejt-sejt kapcsolatokért felelős adherens (pl. E-cadherin - epiteliális cadherin) és szigetelő (tight junctions) struktúrák megjelenését; ezzel biztosítva az epitélium integritását. Számos előrehaladott tumorra jellemző az E-cadherin csökkent jelenléte a sejtek laterális felszínén.

A daganatos sejtek az EMT során motilissá válnak, elveszítik polaritásukat, mely tulajdonságokat nagymértékben a sejtfelszíni adhézis sejtkepcsoló (pl. cadherine) és szigetelő struktúrák (tight junctions) folyamatos elvonásán keresztül szereznek meg (Thiery és mtsai., 2009). Ezt egyrészt a polaritás kialakításáért felelős komplexek komponenseinek (pl. LGL2), másrészt a rögzítő struktúrák, mint pl. az E-cadherin (epiteliális cadherin) szuppresszáálásával érik el; utóbbi esetében számos ráktípusban (pl. mell, gyomor, vastagbél) azonosították annak genetikai változásait (Paredes és mtsai., 2012). De mindezek mellett az endocitózis/exocitózis folyamatának, és a vezikuláris transzportfolyamatoknak a kisiklása is nagyban hozzájárul az epiteliális sejtek motilissá válásához.

A leginkább feltárt adherens komponens az E-cadherin és annak partnere, a β -catenin. Utóbbi kettős funkcióval bír: egyrészt a membránfelszínen a sejt-sejt kapcsolódásokért felel, másrészt, ha megszűnik ez a kapcsolat (legfőképp az E-cadherin endocitózisa során), akkor az E-cadherin által kötött β -catenin a sejtalba transzlokálódik, és aktiválja a Wnt (wingless) útvonalat, mely több fontos, többnyire az embrionális fejlődéshez elengedhetetlen folyamatot irányít. Az E-cadherin endocitózisára számos faktor hat. Ezek közül fontos kiemelni, hogy az aktivált Arf6-GTP komplex az Nm23-H1-et toborozza a kialakuló, klatrinnal borított vezikulákhoz, ahol azok dynamin-mediált lefűződéséhez (és ezzel az E-cadherin internalizációjához) járulnak hozzá (Palacios és mtsai., 2002). Tehát az Nm23-H1 hiánya egyrészt az E-cadherine által biztosított sejtkepcsolatok destabilitását, másrészt a β -catenin nukleáris transzlokációjának zavarát okozza. Az Nm23-H1 további, ide köthető funkcióinak bemutatását ld. az „NME-k szerepe a membránátrendezési folyamatokban” c. fejezetben.

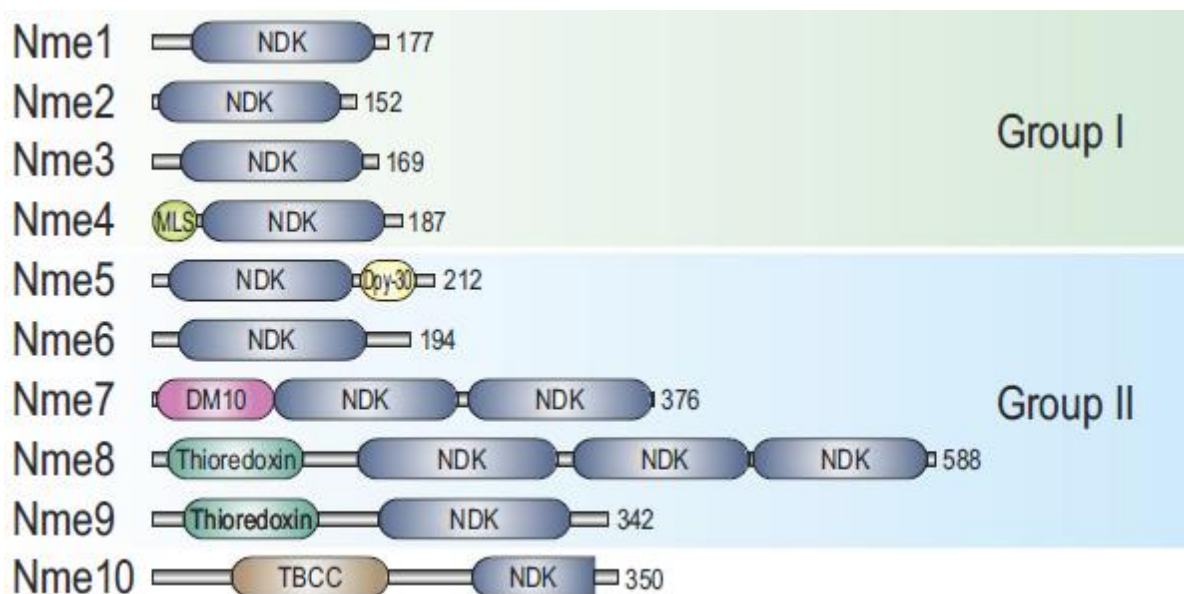
A jövőben várhatóan több sejtadhézis molekula endocitózist fogjuk részletesebben ismerni, ami nem csak az EMT jobb megismeréséhez járulhat hozzá, hanem akár prognosztikus jelentőséggel is bírhat, ugyanis nagyon valószínű, hogy a sejt polaritás fenntartása az egyik utolsó fék, ami visszatartja az adott sejtet a tumorigenezis útján.

3.5 Az NME fehérjecsalád

Mielőtt mélyebben jellemezném a fehérjecsaládot, szeretnék kitérni a nomenklatúrájukra. A fentiekben még NM23-ként voltak említve, mivel nagyon hosszú ideig így referáltak rájuk az irodalomban, így több évtizednyi anyagban NM23 néven fogjuk őket megtalálni. Manapság az új, egységes nomenklatúra bevezetését követően már NME (expressed in non-metastatic cell) fehérjékként említjük őket.

Funkciójukat tekintve nukleozid-difoszfát kinázok (NDPK), nevükből adódóan a nukleotid anyagcserében is van szerepük; a nukleozid-difoszfátok (NDP) nukleozid-trifoszfátokká (NTP) történő átalakítása során a foszfát transzfert katalizálják, függetlenül attól, hogy purin vagy pirimidin bázisú donorokról és akceptorokról van-e szó (Lascu és Gonin, 2000). Ebben a folyamatban a foszfát donor többnyire ATP (adenozin trifoszfát) – mivel ez a legnagyobb koncentrációban fellelhető NTP a sejten belül (Traut, 1994) –, melyet felhasználva ún. pingpong mechanizmussal főleg GTP-t (guanozin trifoszfát) állítanak elő, egy autofoszforilációval létrejövő nagy energiájú foszfo-hisztidin intermediéren keresztül (Cleland, 1963; Lascu és mtsai., 2000).

Az NME fehérjecsalád tagjai evolúciósan konzerváltak, az élet mindhárom doménjében (*Eubacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) képviselik magukat (Bilitou és mtsai., 2009). Az egysejtű organizmusokban általában egy, míg az emberben már 10 izoforma ismert (Boissan és mtsai., 2009; Desvignes és mtsai., 2009) (7. ábra). Általában egy vagy két NDPK doménnel rendelkeznek, de előfordul olyan fehérje is, ami hármat, vagy csak részleges NDPK domént hordoz, amik mellett akár más funkcionális doménnel is rendelkezhetnek, melyek funkciójáról még keveset tudunk. Osztályozásukat tekintve két fő csoportot alkotnak, amik a NDPK aktivitásuk alapján különíthetők el (Desvignes és mtsai., 2009); az első csoport tagjai (NME1, NME2, NME3 és NME4) a katalitikusan aktív kinázok, melyek hexamereket alkotnak (Ćetković és mtsai., 2018), a szervezetekben általánosan kifejeződnek, és 58-88% egyezést mutatnak egymás között. Többnyire a citoplazmában és a plazmamembránnál lokalizálódnak, kivételt képez az NME4, mely specifikus mitokondriumot célzó szekvenciával rendelkezik (Lacombe és mtsai., 2018). A második csoport tagjai divergáltabbak, egymás között és az első csoport tagjaival is összevetve csupán 20-44% azonosságot mutatnak. Közülük csak az NME6 mutat az első csoporthoz hasonló, széleskörű expressziót és NDPK aktivitást, a többi csillós struktúrákban fejeződik csak ki.



7. ábra. A humán NME fehérjék két csoportja, és a tagok doménszerkezete (Ćetković és mtsai., 2015 nyomán). Minden egyes séma után az adott fehérje aminosavszáma van megadva. A különböző domének egyedi színezést kaptak, a rövidítések a következő egységeket jelentik: nukleozid-difoszfát kináz (NDK), mitokondrium lokalizációs szekvencia (MLS), tubulin-specifikus chaperon ko-faktor C (TBCC), Dumpy (Dpy-30), a DM10 pedig ismeretlen funkciójú domén. Az NME10 a csoportokon kívül van elhelyezve, mivel evolúciósan külön utat járt be: részleges NDK doménjét valószínűsíthetően nemrégiben szerezte (Desvignes és mtsai., 2009).

Az NDPK-k oligomer negyedleges szerkezettel bírnak: *Dictyostelium*-ban, *Drosophila*-ban és gerincesekben hexamereket, míg baktériumokban tetramereket formálnak. Az NME1 és NME2 alegységek mindenféle kombinációban képesek funkcionális heterohexamer enzimeket is alkotni, bár egyes beszámolók rávilágítottak, hogy abban az esetben, ha más fehérjékkel -pl. CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) – asszociáltak, akkor nem jelennek meg ezek a kevert komplexek (Muimo és mtsai., 2018). Az evolúció folyamán számos szervezetnél megfigyelhető a második csoport tagjainak elvesztése, ez különösen igaz a nematódákra és a rovarokra (Bilitou és mtsai., 2009), bár a fonálféreg *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) rendelkezik második csoportbeli homológgal (ld. *C. elegans* fejezet).

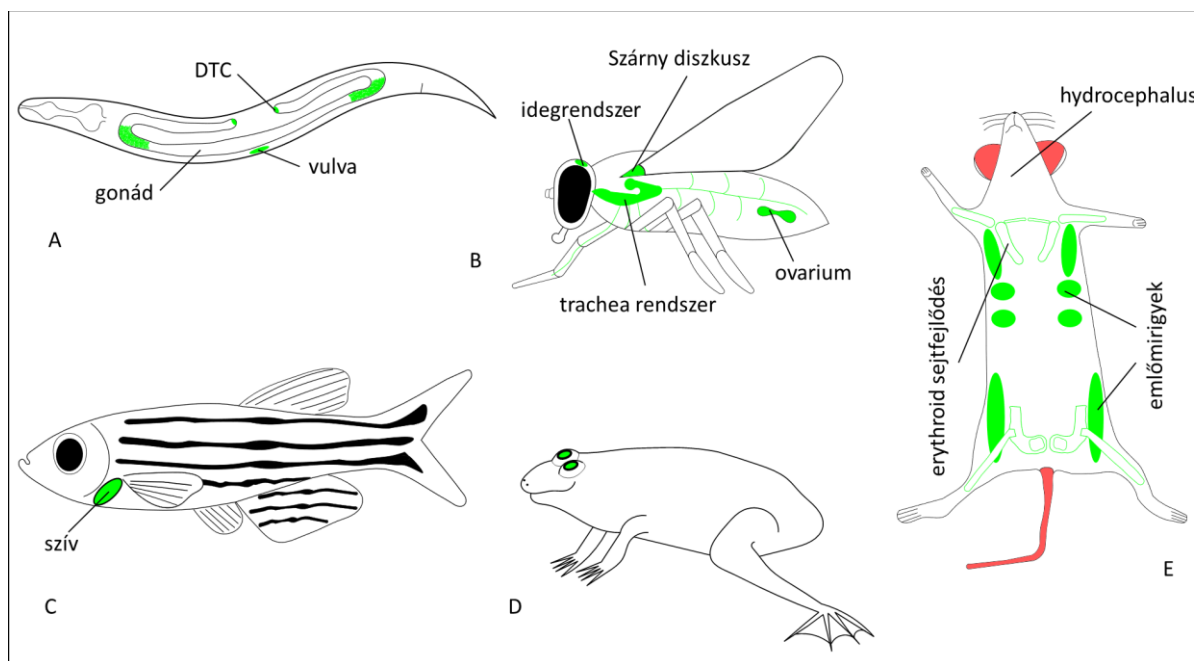
Az NME1 és NME2 a család legabundánsabb tagjai, egyben a legintenzívebben kutatottak, ez különösen igaz az NME1-re, mely az elsőként azonosított MSF (metasztázis szuppresszor fehérje) (Steeg és mtsai., 1988). Hét különböző metasztatikus potenciállal bíró patkány eredetű emlőkarcinóma sejtvonalban eltérő *NME1* expressziót figyeltek meg; konzekvensen a két kismértékű metasztatikus potenciállal rendelkező vonal expresszálta a legnagyobb mértékben az *NME1*-et, melyet fehérjeszinten is megerősítettek (Rosengard és mtsai., 1989).

Az NME1-hez és NME2-höz NDPK szerepükön túl számos funkciót társítottak (Steeg és mtsai., 2011). NDPK aktivitásukhoz hasonló mechanizmussal (ugyanazon domén katalitikus felszínének hisztidinjén keresztül) képesek fehérjéket foszforilálni (Attwood és Wieland, 2015). Ezen felül transzkripciót és génexpressziót szabályozó szerepet is kötöttek hozzájuk (Puts és mtsai., 2018): DNS kötő és nukleáz aktivitás, továbbá 3'-5' exonukleáz aktivitással is bírnak (D. Ma és mtsai., 2004), melynek köze lehet metasztázis szuppresszor hatásukhoz (Zhang és mtsai., 2011). Végezetül DNáz aktivitást is társítottak hozzájuk, mellyel szerepük lehet a Granzim-A mediált (GAAD) sejthalálban (Fan és mtsai., 2003).

Mindemellett számos interakciós partnerüket azonosították, melyeken keresztül különféle molekuláris útvonalakhoz is kapcsolhatjuk őket. Ilyen partnerek lehetnek például sejtvezérlők, onkogének vagy endocitózishoz köthető faktorok. Fontos kiemelni a kis- és nagy GTPázokkal és a heterotrimetikus G-fehérjékkel való kapcsolatukat (Iwashita és mtsai., 2004; Murakami és mtsai., 2008; Zhu és mtsai., 1999). Utóbbiak a GPCR-ek (G-protein kapcsolt/coupled receptorok) által felvett, és közvetített széles spektrumú jeleket továbbítják, melyek számos nélkülözhetetlen folyamatot befolyásolnak a sejtben, olyanokat, mint a növekedés és a differenciáció. Ez különösen fontos az NDPK-k, mint MSF-k szempontjából, mivel fennáll a lehetősége, hogy GTP ellátói a G-fehérjéknek, így létfontosságú szignalizációs szereppel bírhatnak. Ezt a feltételezést segíti, hogy egyes GTPázokkal, mint például a nagy GTPáz dynaminnal fennáll ez a kapcsolat (Conery és mtsai., 2010).

Egy másik fontos szempont az NME fehérjék funkcióinak jobb megértése szempontjából a sejtben belüli pontos lokalizációjuk feltérképezése (Bosnar és mtsai., 2009). Az NME1 és NME2 immunhisztokémiai vizsgálatával kimutatták, hogy túlnyomóan a citoplazmában lokalizálódnak, de előfordulnak a sejtmembránnál is, ahol az NME1 segíti a dynamint a lefűződő vezikulák képzésében, és az intracelluláris transzport szabályozásában. Emellett a sejtmagból is detektáltak jelet, mely korrelál az NDPK-k DNS-hez köthető különböző biokémiai aktivitásaival. Az NME3 a mitokondriumok külső membránjánál lokalizált, mely azonban nem tartalmaz MLS-t (7.ábra); egyelőre azt feltételezik, hogy a dynamin-szerű Drp1-el interaktálva a mitokondriumok lefűződését segíti. Az NME4 már rendelkezik MLS-el, és bizonyításra került a kapcsolata a szintén dynamin-szerű OPA1 (Optic atrophy 1)-el, mely a mitokondriális fúziós eseményeket irányítja (Boissan és mtsai., 2014). A második csoport tagjai többnyire csillós struktúrákban (elsődleges csillók, spermium ostora) fejeződnek ki (Desvignes és mtsai., 2009).

Mindezek mellett extracelluláris környezetben is kimutatható az NME1 és NME2, mint például sejtvonalak tápoldatában (Okabe-Kado és mtsai., 1992), vagy az emberi keringésben (Lilly és mtsai., 2015). Még érdekesebb, hogy ezen fehérjék extracelluláris koncentráció növekedése AML (akut mieloid leukémia) betegekben kemoterápia rezisztenciához vezet, így egyben a rossz prognózis indikátora (Wakimoto és mtsai., 1998). Ez a korreláció akkora mértékű, hogy az extracelluláris NME1 jelenlétét - mely valószínűleg eritrociták pusztulásának következménye (Palmieri és mtsai., 2006) - prognózis markernek használják az AML-ben és a malignus limfómákban (Niitsu, 2001; Niitsu és mtsai., 2000).



8.ábra. NDPK-k egyedfejlődésben betöltött szerepe a különböző modellorganizmusokban (Takács-Vellai és mtsai., 2015 nyomán). Az adott szövet- illetve sejttípus vagy szerv, ahol az NDPK szerepet játszik, zölddel jelölt. **(A)** A *C. elegans* NDK-1 részt vesz a vulva ill. a gonád fejlődésében, szerepe van a disztális csúcsi sejtek (DTC) vándorlásában, és az apoptotikus testek bekebelezésében. **(B)** A *Drosophila* AWD (abnormal wing discs) az imaginális korongok (pl. szárnydiszkusz) fejlődésében tölt be szerepet. Részt vesz a tracheafejlődésben, az ovarium kialakulásában, illetve idegrendszerben betöltött szerepe is ismert. **(C)** Az NME2 kiütése zebrahal embriókban csökkent szívizom kontraktilitáshoz és nem megfelelő véredényképződéshez vezet. **(D)** Békában (*Xenopus*) az NM23-X4 a retina fejlődésében nélkülözhetetlen faktor. **(E)** Nőstény egerekben az NME1 hiánya következtében nem fejlődnek ki teljesen az emlőmirigyek tejsővei, így utódaik kisebb méretűek lesznek. Az NME2 hiánya nem jár látványos fenotípus változással, azonban az NME1-/- / NME2-/- kettős knockout egerek perinatális korban meghalnak az eritroid sejtleszármazás útvonalának súlyos sérülése miatt. Emellett az NME7 knockout egerekben vízfejűséget (hydrocephalus) figyeltek meg, mely hibás csillómozgásra vezethető vissza, aminek következtében nem áramlik megfelelően az agykamra folyadék.

Fontos megjegyezni, hogy a fenti NDPK funkciók az embriogenezis során, vagy későbbi fejlődési állomások alatt fejtik ki hatásukat, az ábrán a felnőtt egyedek megfelelő szerveit jelöltem.

Amennyire intenzíven vizsgált az NDPK-k szerepe tumorokban, illetve patológiás elváltozásokban, annyira kevésbé kutatott fiziológias szerepük. Ezért is szükségszerű intenzívebben vizsgálni az NME fehérjék egyedfejlődésben betöltött szerepét modellorganizmusokban (Takács-Vellai és mtsai., 2015) (8.ábra), már csak azért is, mert számos fontos megfigyelés, mely a humán patológiák lefolyásának jobb megértésére irányul, (állat)modellekből származó megfigyelésekből ered.

Annak ellenére, hogy már a '60-as években fény derült a sejten belüli nukleotid homeosztázis szabályzásában betöltött funkciójukra, és időközben az NDPK-kat számos fiziológiai és patológiás sejten belül lezajló folyamathoz sikerült kötni, a háttérükben álló molekuláris mechanizmusokról kevés ismerettel rendelkezünk. Ahogy bemutatásra került, a magasabb rendű szervezetek genomja több *NME* paralógot is hordoz, melyek különböző NDPK-kat kódolnak, így felmerülhet azok redundáns funkciójának lehetősége; a jövőbeni kutatások egyik fontos célja, hogy azonosítsuk az egyes gének specifikus szerepét mind bizonyos szövetekben, egyedfejlődési stádiumokban, mind az általuk befolyásolt patológiás folyamat(ok)ban.

3.6 NME-k szerepe a metasztázisban

Számos tumortípusban megfigyelhető a korreláció az *NME1* expressziója és a metasztázis folyamata között. Alacsony *NME1* szint (vagy annak hiánya) megnöveli a metasztázis kialakulásának valószínűségét szolid tumorokban (melanóma, mellrák, petefészekrák, kolorektális daganatok, tüdőrák, májrák), így a felsorolt tumortípusokban hiánya a rossz prognózis jeleként is felfogható (Natascia Marino és mtsai., 2012). Azonban ezzel ellentétben például előrehaladott neuroblasztómában, oszteoszarkómában és számos malignus hematológiai betegségben az *NME1* expresszió emelkedett szintet mutat (Tee és mtsai., 2006). Bizonyos esetekben - mint a petefészekrák ill. az emésztőrendszeri daganatok – nem ilyen letisztult a kép, eltérő eredmények láttak napvilágot az *NME1* szint és a prognózis mikéntje között (T. Hsu és mtsai., 2015; Natascia Marino és mtsai., 2012). Az eltérő eredmények részben annak tudható be, hogy az *NME1* és *NME2* szerkezetileg (és sejten belüli lokalizációjukat tekintve is) nagyon hasonló, ezért sokszor az egyikre készített próbák vagy antitestek a másikat is jelölik. Ezt figyelembe véve bizonyos tumorokban esetleges heterogén, azaz eltérő

expressziójuk is módosíthatja a képet, illetve a fent bemutatott NME1 szintek klinikai mérését is befolyásolhatja az NME2 jelenléte, melynek szerepe a metasztázis szétterjedésében alig ismert, és a rendelkezésünkre álló adatok is ellentmondásosak (Y. Li és mtsai., 2015; Thakur és mtsai., 2014). Azt azonban fontos leszögezni, hogy akár az *NME1*, akár az *NME2* szelektív csendesítése nincs hatással a másik fehérje szintjére, ebből következően nem befolyásolják egymás expresszióját és stabilitását (Boissan és mtsai., 2014).

Tovább árnyalja a képet, hogy akár a tumoron belül is eltérő *NME1* expressziót mérhetünk: hepatocelluláris karcinómában és vastagbélrákban kimutatták, hogy amíg a primer tumor nagy részében normális, vagy megnövekedett az *NME1* szintje, addig az invazív frontnál erősen csökkent, vagy el is tűnik. Ezen bimodális expresszió megfigyelésének alapján nem alaptalan a feltételezés, hogy az NME1-nek egyfajta barrierként kiemelkedő szerep jut a karcinóma *in situ* / invazív átmenetkor (Boissan és mtsai., 2010).

A klinikai megfigyelések mellett számos kísérlet is fényt derített az NDPK-k metasztázis gátló szerepére: 1. Az NME1 overexpressziója különböző metasztatikus sejtvonalakban (prostatata, mell, orális karcinóma, tüdő, vastagbél, máj, petefészek, melanóma) csökkentette azok metasztatikus potenciálját (C. E. Horak és mtsai., 2007; Leone és mtsai., 1991; Palmieri és mtsai., 2006) ; 2. Az NME1 RNSi-val való csendesítése következtében az eredetileg nem invazív humán epiteliális tumorsejtek metasztatikus fenotípust mutattak: megváltozott a sejtek adhéziója, inváziós és migrációs képességekre tettek szert, és a szignalizációjuk is a tumorprogresszió felé tolódott. Az NME1-hez nagyban hasonlító NME2 csendesítése nem járt ilyen hatással (Boissan és mtsai., 2010), annak ellenére, hogy az NME2-nek is van metasztázis szuppresszor hatása (Thakur és mtsai., 2011); 3. Ha az NME1 knock-out egereket a hepatocelluláris karcinómára fogékonyra tett egerekkel keresztezték, utódaik tüdejében szignifikánsan megemelkedett az áttétek száma (Boissan és mtsai., 2005).

Ezek mellett még számos eredmény bizonyítja, hogy az NME1 csendesítése a sejtek invazivitását és mobilitását elősegítő folyamatokhoz vezet, így elmondhatjuk, hogy ezen MSF számos funkcióval rendelkezik (Boissan és mtsai., 2010; Durán és mtsai., 2008; W. Ma és mtsai., 2008).

Az NME1 hiánya az E-cadherin közvetített adhéziós sejtkapcsoló struktúrák destabilitását, a β -catenin nukleáris transzlokációjának (mely a TCF/ LEF-1 transzkripció faktor transzaktiválásával hozható összefüggésbe) zavarát okozza. Ezek a folyamatok mind jellemzőek az epiteliális-mezenhimális tranzícióra (Boissan és mtsai., 2010). Itt fontos megjegyezni, hogy mind az NME1-et, mind az NME2-t kapcsolták az integrin jelátvitelhez

(Miyamoto és mtsai., 2009), így szerepük van a fokális adhézió, lamellipodium és filopodia kialakításában, befolyásolva az invazív vá válás folyamatát.

Az NME1 csendesítése kiváltja az invadopodia-k formálódását, melyek MT1 (Metallothionein1)-MMP-függő mátrixbontó tulajdonsággal felruházott specializált kitüremkedései a plazmamembránnak (Boissan és mtsai., 2010). Számos pro-inváziós szignál is aktiválódik az NME1 csendesítésekor: Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), MAPK/SAPK (stress-activated protein kinase), Akt (más néven PKB - Protein kinase B), és a TCF/LEF-1 (lymphoid enhancer binding factor 1)-mediált transzkripció. Ezeket az NME1 deficiencia következményeként kialakult pro-inváziós szignálokat a Rho-GTPázokat, Src-t, PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt-t, MAPK/SAPK-t és a MT1-MMP-t célzó farmakológiai inhibitorok megszüntetik (Boissan és mtsai., 2010). Összességében elmondható, hogy az NME1 csendesítésének hatására beindul számos, a mátrix proteolíziséhez vezető mechanizmus.

Egyre több a bizonyíték arra, hogy a citoplazmás NDPK-k, azaz az NME1 és NME2 a citoszkeleton különféle komponenseivel és regulátorival (aktin kötő fehérjék, intermedier filamentumok, citoszkeleton kapcsoló struktúrák) is kapcsolatban állnak számos szövetben, illetve organizmusban, mely arra utal, hogy egy evolúciósan konzervált és esszenciális kapcsolatról van szó (N. Marino és mtsai., 2013; Moreno és mtsai., 2014; Pinon és mtsai., 1999). Az NDPK-k ezen kapcsolatai azért is fontosak, mert a citoszkeleton szerepe a sejtek motilitásában kulcsfontosságú, ami nagyban meghatározza a metasztázis folyamatát is.

Az NME1-nek számos további kapcsolata is ismert, ilyenek a: kis- és heterotrimerikus G-fehérjék (ld. fent), transzkripciós komplexek (ld. fent), a MAPK útvonal komponensei (Hartsough és mtsai., 2002; Ignesti és mtsai., 2014) és egyéb faktorok, amik az invázióhoz és a metasztázishoz köthetőek (D'Angelo és mtsai., 2004; Raymond és mtsai., 1999). Ezek mellett az NME1 szerepe a GAAD kaspáz-független apoptózis folyamatában is ismert (Chowdhury és mtsai., 2006).

Láthatóan az NME1 fehérje interakciós partnereinek listája hosszú, mely kapcsolatokat vizsgálatával új információkkal gazdagodhatunk mind az NME1 anti-metasztatikus hatásáról, mind magáról a metasztázis folyamatáról.

Végül fontos megemlíteni, hogy máj-, mell-, tüdőrák, uveális melanóma és vastagbél tumorsejtek az NME1 csendesítése következtében inváziós képességekre tettek szert: behatoltak a Matrigelbe –ez egy zselés fehérjekeverék-, ami mimikálja az alapmembránt és a kötőszövetes (stroma) állományt (magas I. típusú kollagéntartalmú) (Boissan és mtsai., 2010; Durán és mtsai., 2008). Ezért is fontos vizsgálati terület, hogy az NME1 expressziója hogyan

hat a tumor strómára, különösen a CAF-okra (rák -cancer- asszociált fibroblasztok), melyek számtalan modellben hozzájárultak a metasztázis inváziós/migrációs lépéseihez (Orimo és Weinberg, 2007).

Továbbra is fontos kérdés, hogy hogyan csökken az NME1 szintje az inváziókor, azaz milyen reguláció alatt áll. Erre több foratókönyv is íródott, melyek közül néhányat sikerült bizonyítani: (1.) mint a többi metasztázis szuppresszor esetén, itt is nagy valószínűséggel epigenetikai leszabályozásról lehet szó; az NME1 promoterének transzkripció starthelyénél megnövekedhet a CpG szigetek metiláltsága, ugyanis DNS metiláció inhibitorok hatására megnövekedett az NME1 expressziója a tumorsejtekben (Hartsough és mtsai., 2001). (2.) Ehhez hasonlóan az SWI/SNF kromatin „remodelláló” komplexhez társított PRMT5 (protein arginine methyltransferase 5) közvetlenül érintett az NME1 transzkripciójának repressziójában (Pal és mtsai., 2004).

(3.) Az NME1 akár fehérje szinten is szabályozva lehet: egyrészt a lizoszómális ciszteín katepszin proteázok révén -melyek szerepe ismert az invázióban-, közvetlenül képesek hasítani és degradálni az NME1-et (Fiore és mtsai., 2014), másrészt az E3 ubiquitin ligáz SCF-FBXO4 (F-box only protein 4) képes az NME1-et poliubiquitinálni, mely végül proteoszómális lebontáshoz vezet (Chen és mtsai., 2015).

Mindezek alapján elmondható, hogy az NME1 az egyik fő szabályozója a metasztatikus kaszkádnak. Az adatok arra engednek következtetni, hogy az NME1 expressziójának helyreállítása az invazív tumorsejtekben egy ígéretes anti-metasztatikus terápia lehet (Carotenuto és mtsai., 2015).

3.7 NME-k szerepe a membránátrendezési folyamatokban, kapcsolatuk a Dynaminokkal

Számos modellben (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, egér és humán sejt vonalak) sikerült kimutatni az NDPK-k szerepét az endocitózisban és az intracelluláris transzportban. A sort ecetmuslica vizsgálatok nyitották meg, ugyanis a 2000-es évek elején mutatták ki a *Drosophila* első csoportbeli NDPK, az *awd* (abnormal wing discs) -mely 78%-os aminosav egyezést mutat a humán NME1-el és NME2-vel is- és a dynamin homológ *shibire* (*Shi*) közötti genetikai interakciót (Krishnan és mtsai., 2001). Az *awd* mutációi megnövelték a *shibire* mutáns paralízisre való hajlamát, melynek hátterében a szinaptikus kapcsolatoknál az endocitózis-mediált neurotranszmitter felvétel folyamata sérül (Krishnan és mtsai., 2001). Később a *Drosophila* epiteliális (trachea és border) sejtekben is megerősítették a két fehérje

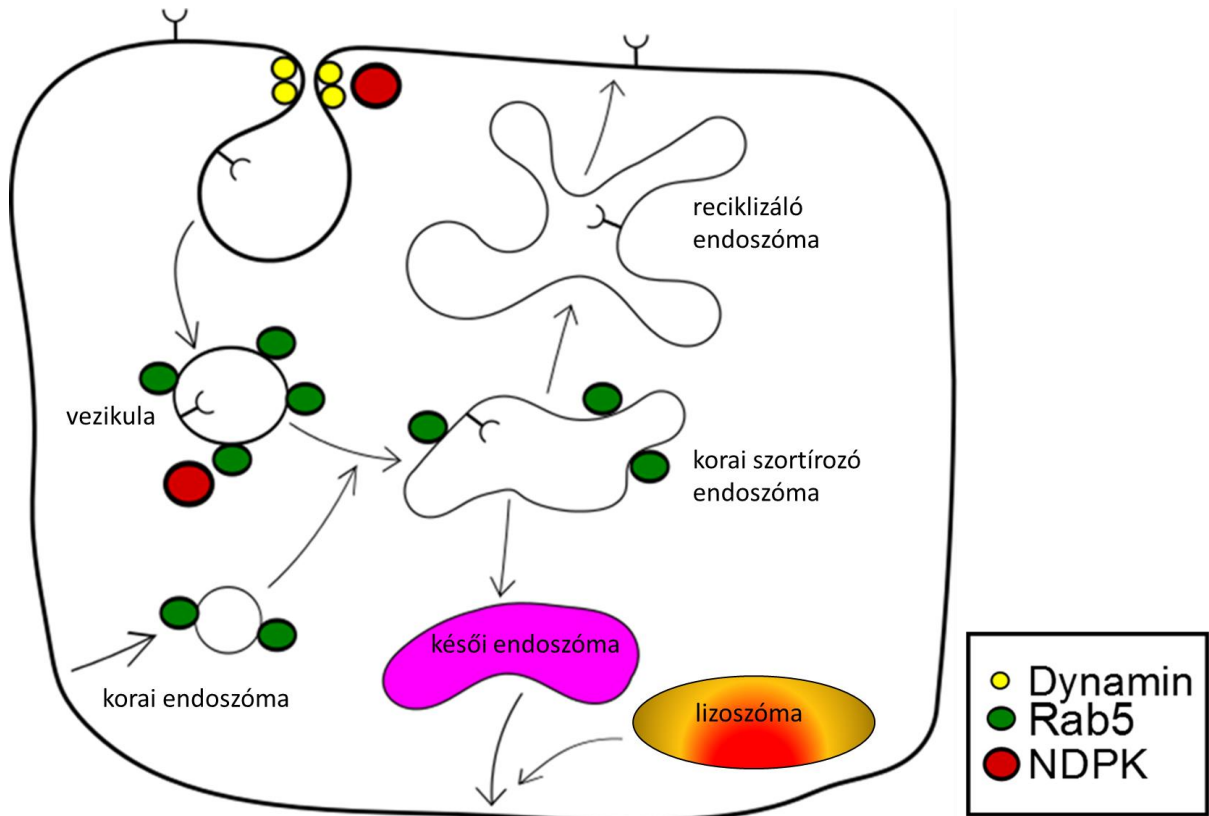
kapcsolatát az FGF (fibroblaszt növekedési faktor) és PDGF/VEGF (platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor) növekedési receptor homológok internalizációjának vizsgálatakor (V. Dammai és mtsai., 2003; Nallamothu és mtsai., 2008). Továbbá az Awd-függő endocitózis a petekamra epiteliális integritását biztosítja a follikuláris sejtek adherens sejtkapcsoló struktúrák szintjének szabályzásával (Woolworth és mtsai., 2009).

Hasonló funkciót tölt be az NME1 a dynamin-mediált endocitózisban a VHL tumorsuppresszorral (Von Hippel-Lindau) ill. az ARF6-al való kapcsolatán keresztül is (T. Hsu és mtsai., 2006; Palacios és mtsai., 2002). A VHL esetében -mely negatív regulátora a HIF- α -nak (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)- az FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) sejtfelszíni megjelenését szabályozza az NME1 közreműködésével, míg az ARF6 az NME1-el való interakcióján túl annak toborzásában is részt vesz. Az NME1/NME2 kiütése megrekeszti a sejtfelszíni receptorok (transzferrin, EGF (Epidermal growth factor), IL-2 (interleukin-2) β alegység) dynamin-mediált endocitózisát emlős (majom és emberi eredetű) sejtekben is (Boissan és mtsai., 2014) (9.ábra). Továbbá *C. elegans*-ban egy genom szintű RNSi vizsgálatkor a nematóda NDPK, az NDK-1 csendesítése a receptor-mediált endocitózis zavarához vezetett (Balklava és mtsai., 2007). Az NDK-1 fehérje további szerepét ld. az előzmények fejezetben.

Összességében elmondhatjuk, hogy az NDPK-k több fajban is funkcionális partnerei a dynaminnak a membrán átrendezési és transzportfolyamatokban (Takács-Vellai és mtsai., 2015). Emiatt fontos pár szót ejteni a dynamin szupercsalád fehérjéiről. Ezek olyan molekuláris motorok, melyek működésükhöz GTP-t használnak. A klatrinnal borított lefűződés (CCP) nyakánál való polimerizációjuk és helikális struktúrájuk kialakításának hatására aktiválódik GTPáz funkciójuk. A kis GTPázokkal szemben kicsi az affinitásuk a GTP-hez (10-100 μ M) és magas GTP hidrolízis rátával bírnak (20 molekula/perc), illetve GTP töltöttségüket nem GEF-ek szabályozzák, hanem annak lokális koncentrációja határozza meg (Warnock és Schmid, 1996). Tehát a dynamin a GTP lokális koncentráció változásaira érzékeny (Antonny és mtsai., 2016; Boissan és mtsai., 2014), ami nagyban támogatja azt az elképzelést, hogy az NME fehérjék NDPK aktivitása közvetlen GTP ellátói a dynamin család tagjainak.

Ezt alátámasztja, hogy az NME1/NME2 hiánya gátolja a dynamin-mediált endocitózist, illetve mimikálja a dynamin nullmutánsok fenotípusát (Boissan és mtsai., 2014; Ferguson és mtsai., 2009): megnövekszik a CCP-k denzitása (sűrűsége), cső-szerűen megnyúlnak, illetve nem képesek leválni a membránról, sugallva, hogy ezen két NDPK szerepe a dynamin-mediált membrán levágásban a CCP-k szintjén jelentkezik. Hasonló irányba mutat az NME1/NME2 ko-lokalizációja az AP-2 komplexel (a klatrin-mediált endocitózis egyik fő komponense) és a

dynaminnal, ráadásul utóbbival fizikailag is kölcsönhatnak (Boissan és mtsai., 2014; Zala és mtsai., 2017). Tehát a citoszolikus NME1 és NME2 GTP-vel látja el a klasszikus citoszolikus dynaminokat (dynamin-1 és 2) a plazmamembránnál, segítve a GTPáz aktivitásukat az endocitózis során. A dynamin-1 idegszövetben fejeződik ki, és a szinaptikus vezikulák endocitózisában játszik szerepet, míg a dynamin-2 általánosan expresszálódik a szervezetben, és a klatrin-mediált endocitózisban -de kismértékben a klatrin független endocitózisban is kulcsszereplő.



9.ábra. NDPK-k szerepe az endocitózisban (Takács-Vellai és mtsai., 2015 nyomán). A fentiekben számos példán át láthattuk, hogy az endocitózis során a különböző organizmusokban az NDPK-k funkcionális partnerei a dynaminoknak. Az endocitikus vezikulák képződése a dynamin GTPáz membránvágó tulajdonságának köszönhető. Ezután egy másik GTPáz, a Rab5 promotálja fúziójukat a korai endoszómákkal. A következőkben a felvett molekulák a szortírozó endoszómába kerülnek, ahonnan a reciklizáló endoszómán át visszakerülnek a membránhoz, vagy a késői endoszóma közvetítésével a lizoszómákban kerülnek lebontásra. *Drosophila*-ban több esetben láthattuk, hogy számos fejlődési folyamat sérül a sejtfelszíni receptorok internalizációjának megváltozása következtében, melynek hátterében az endocitózis nem megfelelő működése áll. Az AWD a *Drosophila* dynaminnal való kapcsolatán túl a Rab5-höz köthető funkcióval is bír, ezzel hatást gyakorolva a korai endoszómák képződésére is (Ignesti és mtsai., 2014).

A citoszolikus NDPK-k és a klasszikus endocitikus dynaminok közötti kapcsolaton túlmenően további NDPK-k GTP ellátó funkciója ismert a dynaminok felé, mely a

mitokondriumhoz köthető. A mitokondrium belső membránjához kötötten figyelték meg az NME4 és a dynamin-szerű OPA1 ko-lokalizációját (Schlattner és mtsai., 2013). Az NME4 kiütésekor a mitokondrium fúziós eseményeihez köthető morfológiai defektusokat (fragmentált, duzzadt) figyeltek meg, mely a citoszolikus NDPK-k hiányában nem történt meg (Boissan és mtsai., 2014; Griparic és mtsai., 2004). Az NME4 lokálisan látja el GTP-vel az OPA1-et, megnövelve annak GTP töltöttségét (Boissan és mtsai., 2014). Az NME4 membránhoz köthető képességét más folyamatban is használja: az NME4 hexamer közreműködésével valósul meg a mitokondriális kardiolipin foszfolipid transzfere a sérült mitokondriumok belső és külső membránja között, mely oxidáltságától függően jelként szolgál a mitofágiának vagy az apoptózisnak (Kagan és mtsai., 2016; Schlattner és mtsai., 2013).

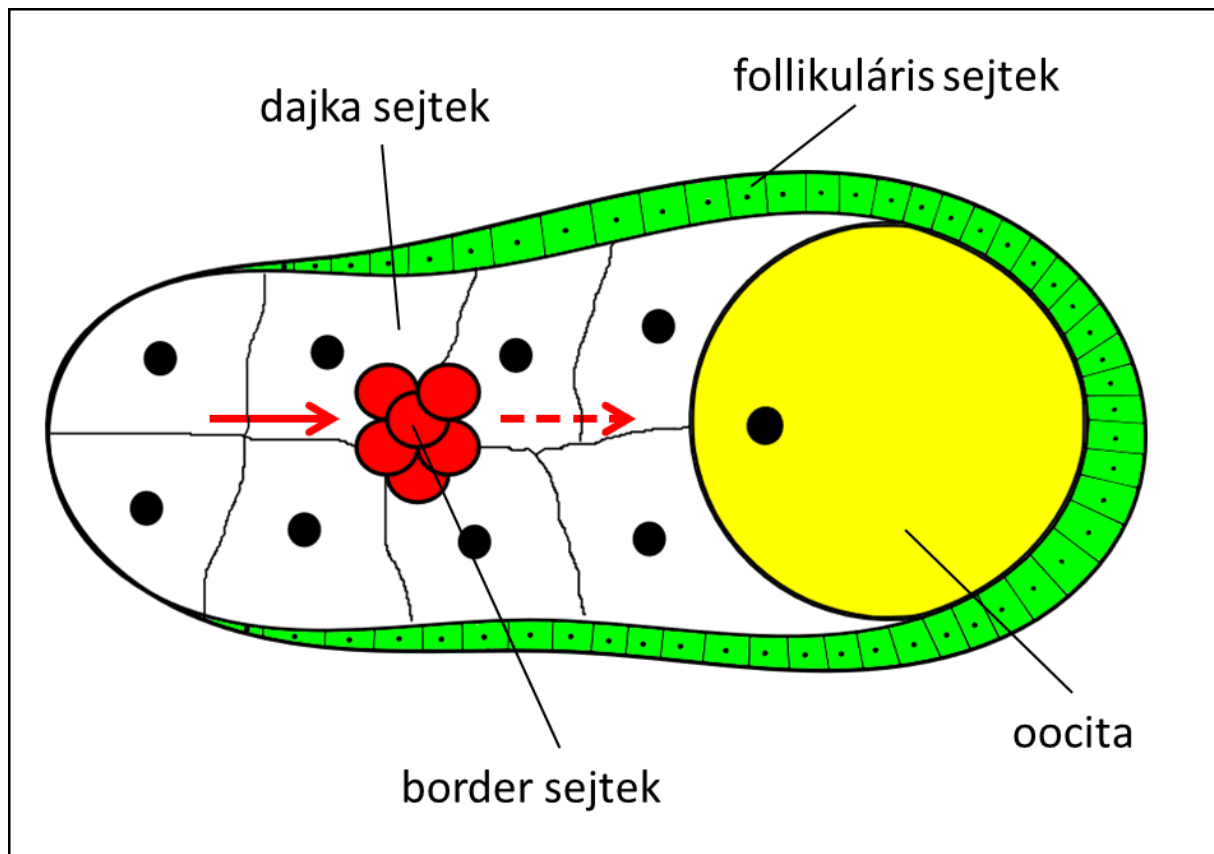
A korábban megemlített NME3 lokalizációja a mitokondrium külső membránjánál is felveti a lehetőségét, hogy az itt szerepet játszó dynamin-szerű DRP1-nek a partnere.

Számos eredmény alátámasztja azt az elképzelést, hogy ugyanannál a szubcelluláris kompartmentnél az NDPK-k fizikai interakciót létesítenek a dynamin család fehérjéivel, hogy GTP-vel lássák el őket a membránátrendezési folyamatok során. Mint láthattuk, ezek a megfigyelések számos fajból és modellből erednek, mely alapján kijelenthető, hogy az NDPK-k szerepe a membránátrendezési folyamatokban egy evolúciósan konzervált mechanizmus.

3.8 Az AWD dóziszfüggő hatása *Drosophila melanogaster*-ben

A korábban bemutatott *Drosophila* AWD negatívan szabályozza a trachea és a petekamra epiteliális sejtjeinek migrációját azok kemotaktikus receptorainak endocitózisán keresztül (V. Dammai és mtsai., 2003; Nallamothu és mtsai., 2008). Először azonban fontos kitérni a petekamra epitélium integritásának fenntartásában betöltött szerepére, mely az első indikáció volt az NDPK-k dóziszfüggő működésére. Itt az AWD a follikuláris sejtek adherens kapcsolóstruktúráinak (E-cadherin, β -catenin, α -spectrin) turnover-ének szabályozásával tartja fenn az epiteliális integritást, melyet ezen komponensek endocitózisán keresztül befolyásol (Woolworth és mtsai., 2009). Kimutatták, hogy mind az AWD hiánya, mind túltermelése hatással van a follikuláris sejtek morfológiájára és struktúrájára. AWD hiányában abnormális struktúrájú epitéliumot figyeltek meg: a kapcsolóstruktúrák abnormális szétterjedésének és eloszlásának következtében a sejtek felhalmozódtak. Az AWD overexpressziója következtében pedig ezen kapcsoló struktúrák elvesztek a follikuláris sejtek felszínéről, ezzel olyan morfológiai változáson átesve (poligonális helyett orsószerű alak felvétele), mely az EMT-re emlékeztet (Bell és Thompson, 2014). Ezek a megfigyelések hívták föl a figyelmet arra, hogy az AWD optimális dózisa kell a follikuláris sejtek adherens kapcsolóinak optimális szinten tartásához (T. Hsu, 2011).

A petekamra border sejtjeinek migrációja a *Drosophila* oogenezis alatt egy szintén ismert modell az epiteliális sejtek vektoriális migrációjának vizsgálatára (Montell és mtsai., 2012). A petekamrában találjuk a csírasejt komplexet (petesejt és a dajkasejtek), melyet az epitélium follikuláris sejtjei vesznek körbe. Ezeknek egy speciális csoportja (6-10 sejt) a border sejtek, melyek az oogenezis során leválnak az epitéliumról, és az oocita anterior pólusa felé migrálnak, ahol a mikropile kialakításáért felelnek (Montell és mtsai., 2012) (10. ábra). Az AWD folyamatosan kifejeződik a follikuláris sejtekben, de a border sejtekben csökkent az expressziója; ez teszi lehetővé migrációjukat, míg az AWD specifikus overexpressziója, illetve kiütése a border sejtekben egyaránt blokkolja azok migrációs képességét (Nallamothu és mtsai., 2008). Főként a JAK/STAT (Janus kinases /signal transducer and activator of transcription proteins) és a PDGF szignalizáció van hatással a border sejtek migrációjára (Duchek és mtsai., 2001; McDonald és mtsai., 2003). Az AWD szerepe a sejt migrációban ezen útvonalak receptorainak internalizációján keresztül valósul meg a *Drosophila* dynamin-nal kooperálva (Duchek és mtsai., 2001; McDonald és mtsai., 2003; Nallamothu és mtsai., 2008).



10. ábra. A border sejtek migrációja a *Drosophila* petekamrában (Takács-Vellai és mtsai., 2015 nyomán). A petekamrát a dajkasejtek és az oocita alkotja, melyeket az epitélium follikuláris sejtjei vesznek körbe. A muslica oogenezise során az *awd* folyamatosan expresszálódik a follikuláris sejtekben, ezzel fenntartva az epitélium integritását. Az epitélium bizonyos sejtjeiben ez az expresszió lecsökken, ennek következtében leválnak az epitéliumról: a follikuláris sejtek ezen migráló csoportja, vagyis a border sejtek az oocitához vándorolnak, és itt alakítják ki a mikropilét. A piros nyilak a border sejtek migrációjának irányát mutatják.

A trachea fejlődése egy ismert modell a csőszerű képletek morfogenezisének vizsgálatára (Affolter és mtsai., 2008). Az embriogenezis korai szakaszában az ektodermális sejtek betűródésével képződnek a tracheális plakodok. Ezekből a képletekből fejlődnek a trachea ágai, melyek megnyúlásukkal és fúziós eseményeiket követően alakítják ki a trachea hálózatát. Fontos kiemelni, hogy ezek az események sejtmigrációs folyamatok következményei, azaz már nem járnak sejtosztódással, mivel a sejtek osztódása véget ér a plakodok kialakulásakor. Ezen migrációs folyamatok nagyban támaszkodnak az FGF/FGFR jelátvitelre: a ligandot (FGF), melyet az előrehaladó tracheacső körüli szövet bocsát ki, a migráló/megnyúló tracheasejtek felszínén megjelenő receptor (FGFR) ismeri fel. Az AWD modulálja a megnyúló sejtek felszínén megjelenő FGFR szintjét, annak endocitózis-mediált reciklizációján keresztül, a *Drosophila* dynaminnal karöltve (V. Dammai és mtsai., 2003), hasonlóan a border sejteknél látottakhoz. Érdekes módon az *awd* homozigóta funkcióvesztéses mutánsok és a heterozigóták (*awd*+/-) eltérő fenotípust mutatnak: míg a homozigótákban a

tracheacsövecskék fejlődése zavart szenved, többnyire szétszórt tracheasejteket figyelhetünk meg, addig a heterozigótákban ektopikus tracheaág migrációt figyeltek meg (T. Hsu, 2011) (11.ábra).



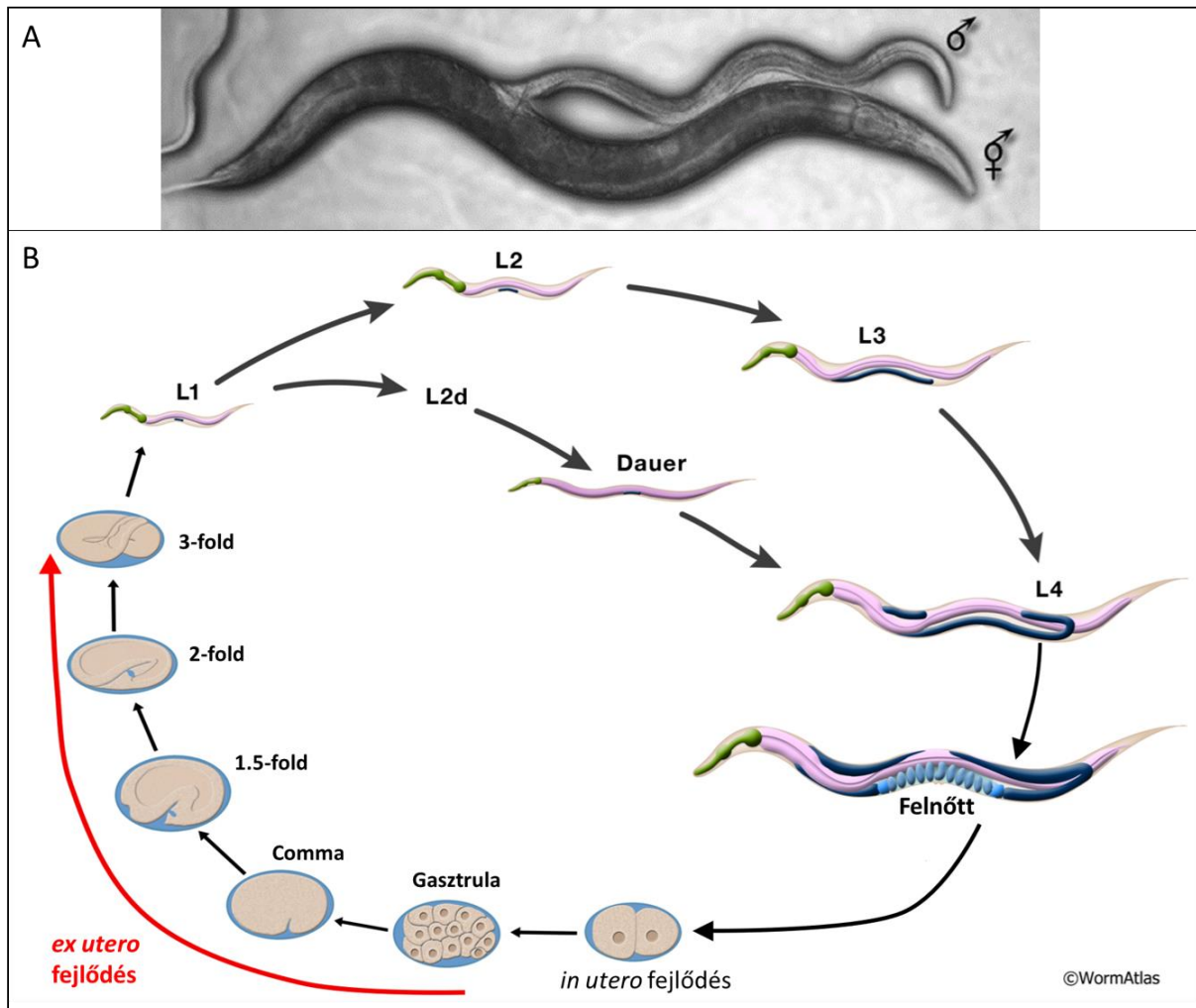
11.ábra. Az *awd* mutáció trachea fenotípusai (T. Hsu, 2011). A bal oldali képen a vad típusú tracheát láthatjuk. Heterozigótákban (középső kép) abnormalis, ektopikus migráció figyelhető meg (melyek nyíllal jelöltek), míg a homozigóta mutánsok (jobb oldali kép) esetében a tracheafejlődés komplett zavara látható, szétszórt, kör alakú trachea sejtekkel.

Ha az AWD *Drosophila*-ban tapasztalt dózisfüggő hatását összevetjük a korábban bemutatott, sejtvonalak migrációs képességeire irányuló vizsgálatokkal, kijelenthetjük, hogy az NDPK-k viselkedésének megismerése a dózisuk függvényében szintén fontos terület, mely egyrészt közelebb visz az NDPK-k funkcióinak megértéséhez, illetve a terápiás lehetőségek kidolgozásánál/pontosításánál érdemes figyelembe venni.

3.9 A *Caenorhabditis elegans* modellorganizmus bemutatása

A *Caenorhabditis elegans* átlagosan 1,2 mm hosszúságú, mérsékelt övi talajban élő, baktériumokat fogyasztó nematoda (fonalféreg). Ugyan ivari dimorfizmust mutat, de a természetben a hímek előfordulása csupán 0,2% (spontán X kromoszóma szegregációs hibával keletkeznek), így a populációk döntő többségét az önmegtermékenyítő hímnős (hermafrodita) egyedek adják (12./A ábra). A megtermékenyített petesejt 25°C-on 52 óra alatt 4 lárvastádiumon (L1-L4) keresztül fejlődik ki ivarérett felnőtté (12. ábra), melyek 4-6 napig képesek szaporodni, majd a reprodukív időszak után még 7-10 napig élnek. Egy hermafrodita viszonylag nagyszámú (közel 250-300) petét rak. Nagy populáció sűrűség, táplálékhiány vagy magas hőmérséklet esetén az L1 stádiumú állatok egy alternatív kitartó forma, a dauer lárvastádiumba lépnek (12./B ábra) (Riddle és Albert, 1997), mely állapotban akár 6 hónapig is képesek életben maradni, majd újbóli kedvező körülmények hatására L4 stádiumú lárvává alakulnak. Testüket nagyságrendileg ezer (a hermafroditákat 959, a hímeket 1031) szomatikus sejt alkotja, melyek között 302 idegsejtet számlálhatunk, amelyek kb. 5000 szinapszist hoznak

létre (S. Ward és mtsai., 1975). A jól definiált számú szomatikus sejteken túl a csíravonal sejtjei is jelentős hányadot tesznek ki.



12. ábra. A *C. elegans* megjelenése és fejlődésmenete (WormAtlas nyomán).

A: A kifejlett egyedek ivari dimorfizmusa: felül a hím, alul hermafrodita látható.

B: Az embrionális fejlődést követően a *C. elegans* négy lárvastádiumon (L1-L4) keresztül fejlődik felnőtté. Kedvezőtlen körülmények hatására az L1 lárvák dauer lárvává fejlődnek, mely akár 6 hónapig is életképes. Kedvező körülmények között L4 lárvákká fejlődnek, és folytatják a normál életciklust.

A *C. elegans* a '70-es évek közepétől vált genetikai modell rendszerré (Brenner, 1974). Eredetileg fejlődésgenetikai vizsgálatokra és az idegrendszer működésének tanulmányozására alkalmazták. Kis testméretének köszönhetően laboratóriumi körülmények között Petri lemezekon, vagy folyadékkultúrában tartjuk fenn (Brenner, 1974). Az önmegtermékenyítő hímnős állatok a tiszta genetikai vonalak egyszerű fenntartását, a hímek pedig ezek kombinálását (keresztezését) teszik lehetővé. Testük áttetsző, így fénymikroszkóp alatt meghatározásra került a teljes sejtleszármazási térképük: minden egyes testi sejt kialakulása, osztódási síkja és egyedfejlődési sorsa ismert (Sulston és Horvitz, 1977). Ezt annak

köszönhetően lehetett megfigyelni, hogy sejtjeiknek leszármazási sorsa invariáns és meghatározott, mivel korai embrionális blasztsejtjeik -a magasabb rendűekkel szemben- nem totipontensek, így elpusztításuk esetén más sejtek nem tudják átvenni szerepüket (Sulston és mtsai., 1977). A *C. elegans* további fontos tulajdonsága, hogy könnyedén, etetési módszerrel lehet génjeiket csendesíteni (RNS interferencia) (Alcazar és mtsai., 2008; Ohkumo és mtsai., 2008). Kémiai mutagének (pl. EMS) vagy – saját (pl. Tc1), vagy akár más szervezetből származó (pl. *Drosophila Mos1* - *Mosaic element 1*) - transzpozonok segítségével is indukálható mutáció az állatokban, szerkeszthető a genomjuk, bár utóbbiban ma már nagymértékben a CRISPR rendszerre támaszkodunk ebben a szervezetben is. Modellállatként nagy előnyük, hogy cseppfolyós N2-ben hosszú évekig tárolhatóak.

1998-ban a *C. elegans*-é lett a metazoák közül elsőként megszekvenált teljes genom: a száz megabázis 20.184 gént hordoz (<https://www.wormbase.org>), mely öt autoszómára és egy ivari kromoszómára oszlik. A *C. elegans* génjeinek 41,7%-a mutat homológiát az emberekével, de még érdekesebb adat, ha ezt megfordítjuk: az emberi genom fehérjét kódoló szakaszának 52,6%-a rendelkezik felismerhető fonálféreg ortológgal (Kim és mtsai., 2018). A *C. elegans* genom szerveződése kompakt, az egy génre jutó bázisszámra vetítve 20-szor tömörebb az emberi genomnál (C. elegans Sequencing Consortium, 1998). Az eukarióták körében egyedül a fonálférgekre, így a *C. elegans*-ra is jellemző az operonos szerveződés, azaz, hogy közös szabályozó régió osztozik kettő vagy több gén (Spieth és mtsai., 1993).

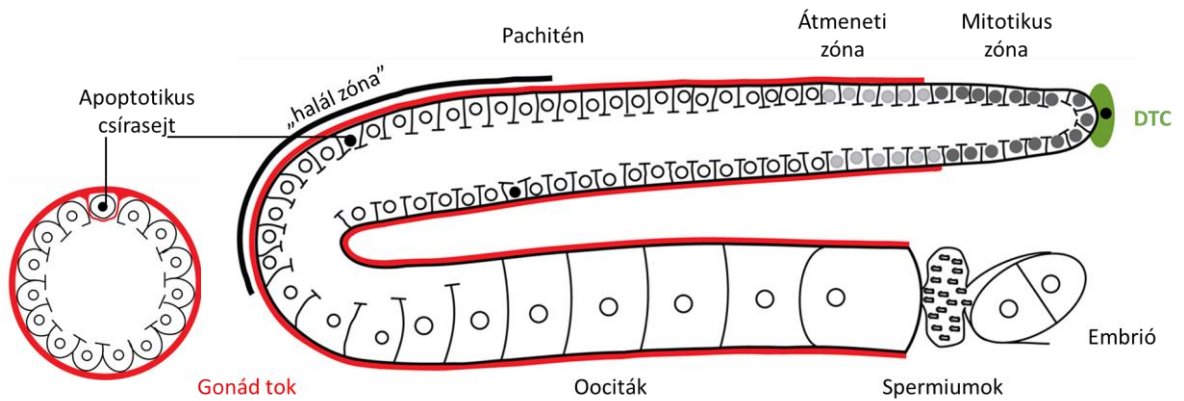
A nemzetközileg elérhető törzsgyűjteményt a Minnesotai Egyetemen tárolják (CGC-*Caenorhabditis* Genetics Center). Több fonálféreg átfogó adatbázisa, a WormBase (www.wormbase.org) naprakészen foglalja össze a *C. elegans*-al kapcsolatos jelenlegi tudásunkat, míg anatómiai jellemzőit a Wormatlas (www.wormatlas.org) képein tanulmányozhatjuk. Ezek mellett a folyamatosan aktualizált Wormbookban (www.wormbook.org) a fonálférgek biológiájáról szóló összefoglaló fejezeteket, módszereket, stb. találunk.

C. elegans-on végzett kutatásokat ezidáig 3 alkalommal jutalmaztak Nobel díjjal: 2002-ben Sydney Brenner, John Sulston és Robert H. Horvitz orvosi, 2006-ban Andrew Fire és Craig Mello szintén orvosi, míg 2008-ban Martin Chalfie kémiai diszciplinában lett elismerve.

3.10 A *Caenorhabditis elegans* mint tumormodell

Számos tumorokkal asszociált gén (onkogének és metasztázis- ill. tumorsuppresszorok) és molekuláris útvonal is konzervált ebben a szervezetben, így a *C. elegans* egyre inkább a tumorigenezis megértését célzó kutatások egyik népszerű modelljévé válik. Ráadásul *C. elegans*-ban sok géncsalád kevesebb tagot számlál, így többnyire a redundancia is kisebb mértékű. Számos, emberi tumorokhoz köthető folyamat jobb megismerését köszönhetjük az ezen a fonálférgen végzett kutatásoknak: a tumorfejlődés jól definiált folyamatainak kutatása mellett – mint a sejtciklus lefolyása, invázió, metasztázis, tumor mikrokörnyezete, tumoros vonatkozású miRNS-ek (Kirienko és mtsai., 2010) - az autofágia és az apoptózis tumoros vonatkozásainak feltárása, illetve az utóbbi időben feltörekvő területek, mint az őssejt átprogramozás, az energia metabolizmus szabályzásának megváltoztatása és a gazdaszervezet emésztőrendszeri mikrobiom vizsgálata egyaránt hozzájárultak a daganatos elváltozások kialakulásának és előrehaladásának megismeréséhez (Kyriakakis és mtsai., 2015). A jól megválasztott, az adott vizsgálat szempontjából ideális modellorganizmusokban (és megfelelő sejttypusban, szervben) végzett kutatások nagy előnye, hogy azonnal láthatjuk adott gének mutációinak megnyilvánulását az általunk vizsgált folyamatokban, illetve szerv, szervezet szinten megnyilvánuló változások is jól megfigyelhetők.

A tumorfejlődésre irányuló *C. elegans* kutatások többretűek, kedvelt alanya a csíravonal, mivel pluripotens és immortális, felnőtt állatokban csak itt figyelhető meg az apoptózis (sejtkárosodáskor, vagy fejlődési folyamatok részeként), mely ráadásul a testi sejtekkel ellentétben nem mutat meghatározott (invariáns) mintázatot, sőt, a gonád disztális régiójában syncytiumot alkotnak (13. ábra). Annak ellenére, hogy sejtciklus-defektusok a szomatikus sejtekben is lejátszódnak, tumor-szerű fenotípusokat csak a csíravonalban figyeltek meg eddig: ha ugyanis a sejtciklus ill. az apoptózis folyamata sérül, a tumorfejlődéshez hasonló abnormális proliferáció játszódik le. Ekkor az őssejt niche kiterjedésének következtében több mitotikusan aktív mag halmozódik fel a gonádban, melyek nem képesek gamétákká differenciálódni (Gartner és mtsai., 2008; Joshi és mtsai., 2010). Ez, a csíravonalat érintő tumoros elváltozás történhet sejt-autonóm (magában a csíravonalban történik az elváltozás), és nem-sejt autonóm (csíravonalra ható szomatikus eredetű folyamatok zavara) módon. Mivel a felnőtt hermafroditákban ez az egyetlen szövet, mely őssejteket hordoz, így benne a replikatív halhatatlanság ill. a pluripotencia fenntartása, és a rájuk ható folyamatok is vizsgálhatóak, melyek mind jellemzői a tumoroknak (Smelick és Ahmed, 2005).



13. ábra. A felnőtt hermafrodita *C. elegans* gonádkarja és csíravonala (Wormbook nyomán)

A csíravonal sejtjeit a gonád csúcsában található csíravonal összegek termelik, melyek osztódását a DTC (distal tip cell) szabályozza, bár nem az egyetlen szomatikus sejt, mely hatással van ezen sejtek osztódására és differenciálódására: a proximális gonád szomatikus sejtjei is szabályozzák őket, és bizonyos körülmények között a csíravonal tumorok kialakulásáért is felelősek (Kirienko és mtsai., 2010). Az egyedfejlődés korai szakaszaiban spermiumokat (melyek a spermatékában tárolódnak), majd felnőttkorban oocitákat képeznek. A gonád több részre osztható: a kezdeti, mitotikus zónát egy átmeneti zóna váltja, melyet követően meiózissal osztódnak a csíravonal sejtjei, amiket csak részlegesen választ el a plazmamembrán, így közös citoplazma résszel rendelkeznek (rachis). A csírasejtek apoptózisa (fekete maggal jelölt sejtek) legfőképp a gonád kanyarodó régiójában figyelhető meg (fekete szakasz); ekkor tartanak a pachitén szakaszban. Őket a gonád tokját alkotó sejtek (piros) kebelezi be. A csírasejtek apoptózisa az oogenezis során történik, ezért lárvákban és hímekben nem figyelhető meg. A túlélő sejtek a pachiténből való kilépést követően a gonád proximális régiójában már egyedileg elkülönülő oocitákká alakulnak, melyek nem sokkal később érésüket követően megtermékenyítésre kerülnek.

C. elegans-ban végzett megfigyelésnek köszönhetően ismertük meg jobban a tumorprogresszió során fellépő kapcsolatot a hipoxia és az apoptózis között (Sendoel és mtsai., 2010). Emellett ennek a szervezetnek köszönhetően az autofágia (mely sokszor az apoptotikus sejthalál elkerülését segíti) daganatokban betöltött szerepéről is többet tudunk: az útvonal, melyben a tumorszuppresszor FLCN (Folliculin) kifejti hatását, *C. elegans*-ban lett felderítve (Sendoel és mtsai., 2010). Ebben a kutatásban azt találták, hogy az FLCN *C. elegans* homológia (*flcn-1*) az AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) (és így az autofágia) negatív regulátora, meggátolva a tumor kialakulását. Ugyancsak *C. elegans*-on végzett genom szintű RNSi screen-nek köszönhetően azonosítottak 45 gént, ill. ezeken keresztül olyan útvonalakat (ceramid és mevalonát anyagcsere), melyek a mitokondriumok védelméért, helyes működésének biztosításáért felelnek (Y. Liu és mtsai., 2014). Emlő tumorban a mevalonát útvonalnak fontos szerep jut a mitokondrium-vezérelt apoptózis folyamatában, így daganat ellenes terápiák potenciális célpontja lehet (Fritz, 2009). Emellett további, rák elleni

hatóanyagok célzott keresésére is kiválóan alkalmas ez a modellszervezet: az egyik leginkább ismert ilyen célpont, az EGFR (epidermális növekedési faktor receptor), mely számos humán daganatban túlaktivált, és a tumorfejlődés több lépésében is szerephez jut. Az EGFR útvonalra számtalan hatóanyagot teszteltek modellként használva a *C. elegans* vulvafejlődését (melynek defektusai látványos fenotípus változásokkal járnak) (González-Pérez és mtsai., 2010). Egy másik, előzetes (pilot) screenben transzgenikus - humán tumorokban azonosított - EGFR mutáns törzsek felhasználásával több, mint 8000 hatóanyagot teszteltek, melyek közül EGFR és MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase) inhibitorokat sikerült azonosítani (Bae és mtsai., 2012).

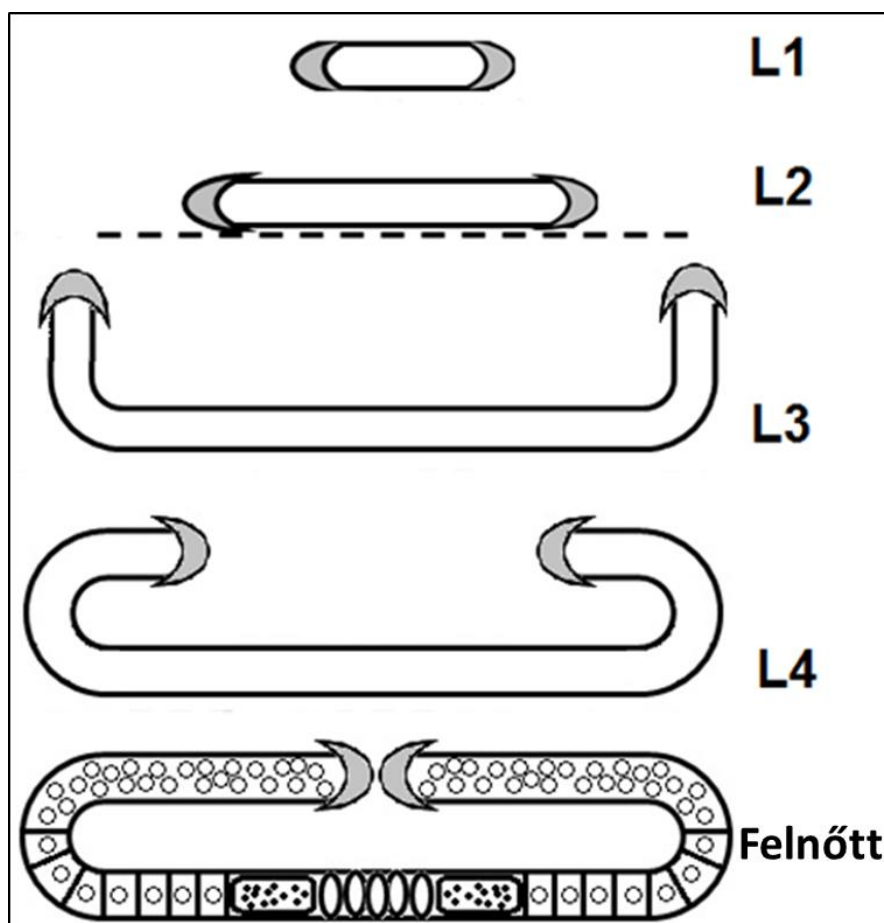
Összességében elmondható, hogy a fenti modellek egy széles körben és könnyen alkalmazható rendszerré teszik a *C. elegans*-t a tumor- és őssejtkutatásokban is. Továbbá kiemelném a következőkben bemutatásra kerülő, általunk végzett kutatásokat, melyek a sejtmigráció és az apoptotikus testek eltávolításának fejlődésbiológiai, illetve tumorbiológiai vonatkozásaira irányulnak.

3.11 A disztális csúcsi sejtek (DTC-k) migrációja *C. elegans*-ban

Az áttétképzés egyik legfontosabb -és egyben kezdeti- folyamata a tumoros sejtek migrációja, melyben kulcsszerep jut a citoszkeleton átrendezésének. A sejtmigráció molekuláris mechanizmusa evolúciósan konzervált folyamat (Lehmann, 2001), fontos szerepe van az embrionális fejlődésben, a morfogenezisben, immunitásban, regenerációban. A folyamat jobb megértéséhez nagyban támaszkodunk különféle modellorganizmusokra, melyekben fiziológias körülmények között vizsgálhatóak a vándorló sejtjeik. A *C. elegans* számos, az egyedfejlődés során migráló sejtípussal rendelkezik, melyek az egyedfejlődés során ugyanazt az utat járják be. Ezek a P sejtek, a Q neuroblasztok, a szex izomsejtek és a korábban megemlített DTC-k; (Shakir és Lundquist, 2005). Ezek az irányítottan mozgó sejtek kiválóan alkalmas modellek a sejt vándorlás folyamatának megismeréséhez, hogy miként veszik fel / hatnak mozgásukra (pl. irányultság) a környező szignálok, mely molekulák érintettek a szignalizációban, ill. a mozgás kivitelezésében (pl. integrinek, GTPázok, citoszkeleton komponensei).

A két disztális csúcsi sejt (DTC) vándorlása az egyik közkezdelt modellje a sejtmigráció vizsgálatának, melyek vezérsejtként a gonád morfogeneziséért felelnek. Számos egyedfejlődési (lárva) stádiumon keresztül, egymáshoz viszonyított tükrökép-szerű vándorlásuk során alakítják ki a két, szimmetrikus, „U” alakú gonádkart (14. ábra), minden egyes egyedben

univerzális időzítéssel, tehát migrációjuk szigorúan meghatározott térben és időben. Ez a szabályzás adja meg a pontos fordulópontokat a gonád kanyarodásakor, illetve, hogy mikor kell megállniuk a DTC-knek a gonádfejlődés végeztével.

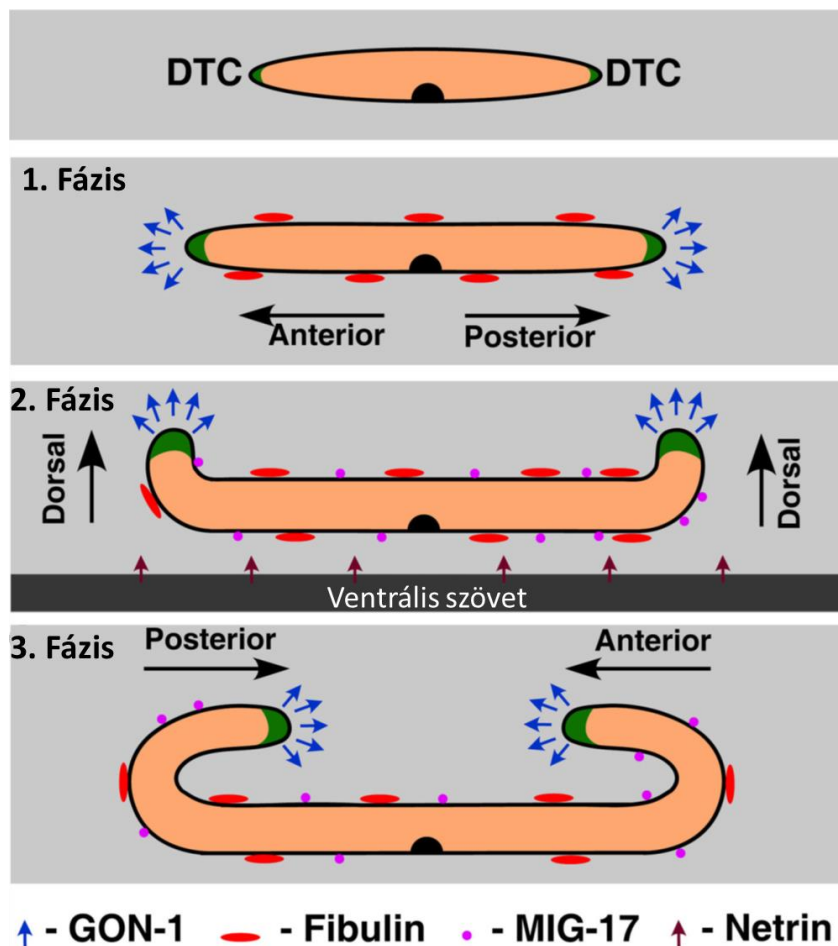


14. ábra. A DTC-k vándorlása és a gonád kialakulása a *C. elegans* egyedfejlődése során (Fancsalszky és mtsai., 2014 nyomán)

A sematikus ábrán a két sarló alakú, szürkével jelzett DTC az L1 lárvastádiumban a gonádprimordium disztális végein helyezkedik el. Az L1 és L2 lárvastádiumokban a migráció első (vagy ventrális) fázisában ligandok hatására megkezdik migrációjukat a ventrális testfalizomzat (szaggatott vonal) mentén. Az egyik csúcsi sejt az állat anterior, míg a másik annak poszterior vége felé indul. L3 lárvastádiumban a DTC-k az állat dorzális oldala felé, a testfalizomzatra merőlegesen elkanyarodnak; ez a migráció második fázisa. Az ezt követő, harmadik (vagy dorzális) fázisban, immár L4 lárvastádiumban ismét merőlegesen fordulnak, immár a test közepe felé, és folytatják útjukat proximálisan, míg meg nem állnak a vulvával szemben, kialakítva a két „U” alakú gonádkart, ekkorra elérve a kifejlett felnőttkort.

A DTC-k migrációja egy bonyolult, összehangolt folyamat, számtalan gént azonosítottak, mely érintett a gonád morfogenezisében (Cram és mtsai., 2006; Nishiwaki, 1999), melyekhez számos folyamat társítható: citoszkeleton átrendezés, sejtkapcsolatok regulációja, ECM újra alakítás, sejt szignalizáció, sejtsors meghatározás, génexpresszió, és nem utolsósorban a fejlődési stádiumok időzítése. Mára sok gén esetében pontosan tudjuk, hogy a DTC migráció mely lépésénél

milyen szerepet tölt be (Wong és Schwarzbauer, 2012), de még mindig újabb-és újabb génről, illetve szabályzó RNS-ről derül ki, hogy érintett ebben a folyamatban. Ennek ellenére a DTC-k tér- és időbeni szabályozásáról (mikor forduljanak, mikor álljanak meg, haladási sebességük, stb.) még sok a feltáratlan kérdés, legfőképp, mivel külső tényezők (pl. kemotaktikus molekulák) is befolyással vannak rájuk, ráadásul migrációjuk sokszor más egyedfejlődési folyamatokkal összehangoltan zajlik. A főbb molekuláris lépések a 15. ábrán kerülnek bemutatásra.



15. ábra. A DTC migrációt befolyásoló legfőbb fehérjék (Kirienko és mtsai., 2010 nyomán)
 L2 lárvastádiumban a két, ventrálisan elhelyezkedő DTC (zölddel jelölve) megkezdte a 3 fő fázisra osztható vándorlását (adott fázisban a fekete nyilak jelölik a migráció irányát), melynek végeztével kialakulnak az „U” alakú gonádkarok. A DTC-k által expresszált GON-1 (abnormal GONad) promótálja magát a vándorlást, az alapmembránban található FBL-1/ fibulin degradálásával - mely az alapmembrán integritásáért felel -, segítve a DTC előrehaladását. A második fázisban az előzőek mellett a MIG-17-nek és a ligand UNC-6 (UNCoordinated)/netrinnek jut kulcsszerep, utóbbi „taszító” jelként fogható fel; az erősebb ligandkoncentrációtól való elfordulás eredménye az első irányváltás. A MIG-17 (abnormal cell MIGration) egy MMP, melyet a testfalizomzat sejtjei szekretálnak, majd az izmok és a gonád falára kötnek, és a mátrix bontásában vesz részt, ezzel segítve a DTC haladását. A 3. fázisban bekövetkező elfordulás mikéntjéről még keveset tudunk.

Fontos kiemelni az egyes lépésekhez társított, ismert receptorokat; ezek az integrinek és a netrin receptorok. Mostani tudásunk szerint mindkét csoport érintett a két gonád kanyar kialakításában, de az egyes kanyarok megtétele mögött eltérő mechanizmusok húzódnak. Az első kanyar (mely elválasztja a DTC migrációjának első és második fázisát) háttérben álló mechanizmusok a jobban feltártak. Ekkor a netrin szignalizációnak jut kiemelkedően fontos szerep (Ziel és Sherwood, 2010): az UNC-6/ netrin ligand, és az őt felismerő két alegységből felépülő (UNC-5 és UNC-40) receptor aktivitásának következtében fordul el az addigi haladási irányára merőlegesen a DTC. Emellett az integrineknek is jut szerep, ugyanis a DTC a teljes migrációja során kifejezi őket (BurrIDGE és mtsai., 1997; Cram és mtsai., 2006). Ezek olyan sejt-adhéziós transzmembrán receptorok, amik egy α -alegységből (lehet INA-1 (INtegrin Alpha) vagy PAT-2 (Paralysed Arrest at Two-fold)) és a β -alegységből (PAT-3) állnak össze. Funkciójuk az ECM és az aktin citoskeleton összekapcsolása (BurrIDGE és mtsai., 1997).

A második kanyar megtételekor a DTC-k az állat testének közepe felé fordulnak vissza. Az előző lépéssel ellentétben, ahol az UNC-6 bizonyult egyfajta mesterregulátornak, itt még nem azonosítottak olyan fehérjét/szignalizációt, mely a gerincét adná a dorzális alapmembrán felé fordulásnak. Az integrin jelátvitel az első kanyarban betöltött szerepénél jelentősebben lép fel, de számos más gént is kötöttek már ehhez a folyamathoz. Legfőképp az adhéziós ill. a különböző szignalizációkban résztvevő fehérjékre érdemes fókuszálni. Ilyen, fontos szereppel bíró fehérje az SRC-1 (SRC oncogene related), mely az integrinokkal asszociált tirozin kináz. Mutáns fenotípusai (DTC migrációs defektusok) az általa nem foszforilált targetek (melyek között az integrinek és az UNC-5 citoplazma felőli doménje is szerepel) inaktivitásából adódnak (Anthis és Campbell, 2011; Sun és mtsai., 2011). Így az SRC-1 jó eséllyel köti össze és koordinálja az integrin és netrin útvonalakat, melyeket már korábban emlős rendszerben összefüggésbe hoztak az egyedfejlődés során fellépő sejtmigráció vizsgálatokor (Nikolopoulos és Giancotti, 2005), nagy eséllyel még nem azonosított fehérjékkel karöltve.

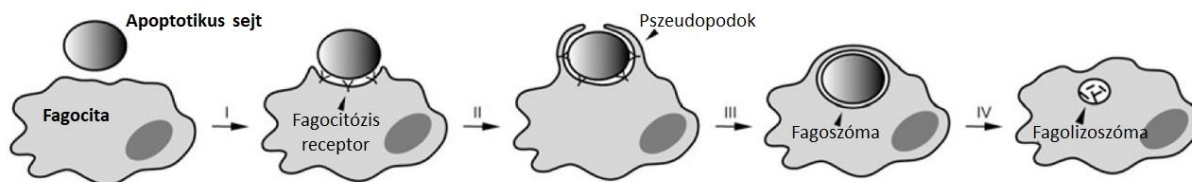
3.12 Az apoptotikus sejtek bekebelezése

A korábban bemutatott endocitózis masinériája két fő típusra osztható. Az egyik a pinocitózis, mely minden sejtre jellemző konstitutív (azaz folyamatos) folyadék, ill. abban oldott anyagok felvételét jelenti. Ezzel szemben fagocitóziskor szilárd részecskék felvételéről van szó, melyeket csak specializált sejtek (fagociták) végeznek, a folyamat pedig azok receptorainak aktiválásával indul be, különleges ingerek (ligandok) hatására (ezek lehetnek pl. az immunválaszban résztvevő antitestek -amiket az Fc receptorok érzékelnek-, oligoszacharidok, stb.). Fontos megemlíteni, hogy a kórokozókön kívül a fagociták képesek nem élő anyagokat (mint azbeszt, latex, üveg), és apoptózissal elhaló sejteket (efferocitózis) is bekebelezni. Utóbbi tulajdonság mind fejlődésbiológiai, mind patológiás eseményekkor jelentős, a következőkben erre helyezem a fókuszot.

Magára az apoptózis jelenségére, azaz a programozott sejthalálra a '70-es években figyeltek fel (Kerr és mtsai., 1972), melyet részleteiben legfőképp *C. elegans*-on végzett vizsgálatokkal ismerhettünk meg (Ellis és Horvitz, 1986; Sulston és Horvitz, 1977). Részen ezért a felfedezésért ítélték oda a korábban említett egyik *C. elegans*-hoz köthető Nobel-díjat. Az állat áttetsző testfalának köszönhetően fénymikroszkóppal könnyen lekövethető a sejtek osztódása, leszármazása, ill. egy másik nagy előny, hogy az apoptózis hiánya nem letális ebben az állatban, így az apoptózis molekuláris hátterének feltárására jó vizsgálati rendszer (Ellis és Horvitz, 1986). A *C. elegans* egyedfejlődése során 131 szomatikus sejt pusztul el genetikailag meghatározottan. Ezekben egy -sejttípustól függően ismert (pl. CES-1 (Cell death Specification), CES-2, TRA-1 (TRANSformer)) (Horvitz, 2004), vagy az esetek többségében máig ismeretlen- upstream jel hatására az EGL-1 az apoptotikus mesterregulátor CED-9 (Cell Death abnormality)-hez köt - ami a mitokondrium külső membránján található-, mely „elereszti” az addig általa kötött pro-apoptotikus CED-4-et, ami végül aktiválja a CED-3 kaspázt, mely felelős számos sejtes komponens bontásáért. A folyamat konzerváltnak bizonyult, ezek a fehérjék emlősökben is hasonlóan működnek (EGL-1 (EGg Laying defective)/ BH3-only, CED-9/ Bcl-2, CED-4/ Apaf-1, CED-3/ kaspáz-9). Az apoptotizáló sejteknek számos jellegzetességük van, ilyenek a zsugorodás, nukleáris fragmentáció, kromatin kondenzáció és a plazmamembrán bimbózása. Az apoptotikus testek normális esetben nem generálnak gyulladást, egyrészt, mivel membránjuk körülveszi őket, valamint eliminálásuk a bekebelezésüket követően sejteken belül történik.

A sejtek apoptózissal való elpusztulásához hasonlóan bekebelezésük is konzervált folyamat, szintén számos eredmény származik *C. elegans*-ból, melyben a makrofágok hiányában az elhaló sejt körüli szomszédos sejtek valamelyike fagocitál. Az egyedfejlődés

során elpusztuló 131 szomatikus sejtet az őket körülvevő sejtek, míg az oogenezis során elpusztuló csírasejteket (közel minden 2. apoptotizál) a gonád tokjának sejtjei kebelezik be. Az apoptózissal elpusztuló sejt speciális, rá jellemző szignálokat fejez ki a felszínén, melyeket a bekebelező sejt receptoraival felismer; ez az apoptotikus bekebelezés folyamatának első lépése. Sok ilyen, ún. „eat me” (egyél meg) szignált prognosztizálnak, ilyenek a PS (foszfatidilszerin), ICAM3 (intercellular adhesion molecule-3), a szénhidrátok (aminocukrok, mannóz), és a calreticulin (Gardai és mtsai., 2006). Ezek közül a leginkább elfogadott, és egyben kutatott fehérje a PS. A felismerést követően az aktivált receptorok stimulálják a membrán megnyújtását, illetve az aktin sejtvázs újra rendeződését; a fagocitáló sejt állábak (pszeudopodok) növesztésével körülöleli az elhalt sejtet. Amint az állábak összeérnek, fuzionálnak, ezzel végérvényesen bekebelezve az apoptotikus sejtet, majd a plazmamembránról leválva kialakul a membránnal határolt fagoszóma. A fagoszóma érésnek indul, eleinte korai, majd késői endoszómákkal fuzionál, melynek következtében egyre inkább elsavasodik, mivel ezek az endocitikus organellek növelik a V-ATPáz koncentrációt a fagoszóma membránjában (Beyenbach és Wieczorek, 2006; Sun-Wada és mtsai., 2009). Végül a fagoszóma fuzionál a lizoszómával, és az apoptózissal elhalt sejt végérvényesen degradálódik (16.ábra).



16. ábra. Az apoptotikus sejtek eliminálásának négy fő lépése (N. Lu és Zhou, 2012 nyomán)

(I) felismerés, (II) pszeudopod növekedés, (III) fagoszóma kialakulása: a pszeudopodok végeinek záródásával véget ér a bekebelezés folyamata, (IV) fagoszóma érés: a fagoszóma további érési folyamatokon esik át (fúzió endoszómákkal), majd lizoszómákkal fuzionálva az apoptózissal elhalt sejt végérvényesen degradálódik.

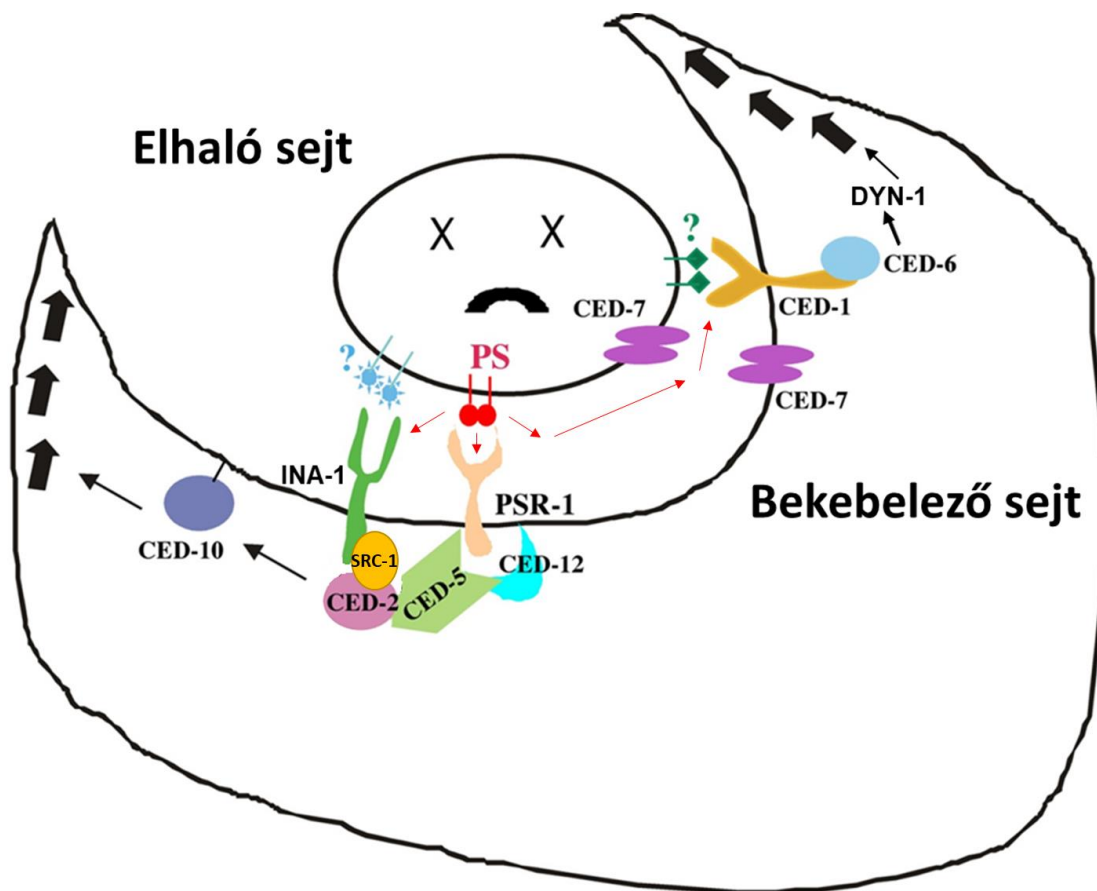
A fentiek háttérében működő gének két fő, részben átfedő jelátviteli útvonalba sorolhatóak (Mangahas és Zhou, 2005). Az egyik tagjai a fagocitózis receptor CED-1 mellett a CED-6 és CED-7, míg a másik útvonal a CED-2, CED-5, CED-10, CED-12 fehérjéket foglalja magában, mely az emlős Rac GTPáz szignalizáció megfelelője. Ezek a gének egy olyan genetikai szűrés során lettek azonosítva, mely során életképes állatokat kerestek, amikben megfigyelhető volt az apoptotikus testek felhalmozódása; azaz a bekebelezés folyamata sérült (Peter W Reddien és Horvitz, 2004). A két útvonal vélhetően a CED-10-en konvergál; így

szabályozva a bekebelezéshez szükséges sejtvááz átrendezést (Kinchen és mtsai., 2005), bár érdemes szétváasztani őket, ahogy az a következőkben bemutatásra fog kerülni (17. ábra).

A CED-1 a fagocitózis specifikus transzmembrán receptora, kizárólag bekebelező sejtek felszínén jelenik meg. Felismerve az elhaló/elhalt sejteket, a bekebelező sejt plazmamembránjának ezen részén („fagocitikus kupa” / phagocytic cup) a CED-1 receptorok koncentrációja megnő, majd az apoptotikus sejt „eat me” jeleinek hatására – pl. a PS - aktiválódik, ezzel beindítva a pszeudopodok növekedését (Zhou és mtsai., 2001). A CED-1 PS általi aktivációjában egy közvetítő fehérjének, a TTR-52 (TransThyretin-Related family domain)-nek van nélkülözhetetlen szerepe, melyet a bélsejtek szekretálnak (Xiaochen Wang és mtsai., 2010). A CED-7-nek (mint ABC1 transzporter homológ) az „eat me” jelek közvetítésében van szerepe: kifejeződik az elhaló sejtek felszínén is -ahol az „eat me” (PS) jel kijuttatásában fontos fehérje-, és a bekebelező sejt felszínén is, ahol a CED-1-et segíti a jel felismerésében (Venegas és Zhou, 2007). A CED-6 közvetíti az aktivált CED-1 jelét, aminek hatására a fagocitikus kupához toborzódnak a bekebelezéshez szükséges fehérjék és organellek (vezikulák, endoszómák), és megkezdődik a pszeudopodok növekedése. Mindemellett a CED-1 és CED-6 a CED-10-mediált aktin átrendezés folyamatára is hatással van (Kinchen és mtsai., 2005), mely szintén fontos tényező a pszeudopodok növekedésekor. A CED-1 útvonal végpontján a DYN-1 (dynamin) - *C. elegans* nagy GTPáza - helyezkedik el, mellyel a bekebelezés után a fagoszóma érés kezdeti szakaszához is társították ezt az útvonalat (Yu és mtsai., 2006, 2008). A bekebelezés során a DYN-1 átmenetileg felhalmozódik a fagocitikus kupánál, ahol egyrészt idetoborozza a korai endoszómákat, ill. segíti azok fúzióját a plazmamembránnal; ezzel biztosítva a pszeudopodok növekedéséhez szükséges membrántöbbletet (Yu és mtsai., 2006). Láthatjuk, hogy DYN-1 -a fehérjecsaládjához hasonlóan- többféle molekuláris funkcióval rendelkezik, ezek közül a legjobban tanulmányozott a membrán vágó aktivitása, ami nélkülözhetetlen az endocitikus vezikulák - jelen esetben a fagoszóma- plazmamembránról való leválásában (Schmid és Frolov, 2011), mely a bekebelezés végső lépése.

A másik útvonal is nélkülözhetetlen a bekebelezés folyamatában (17. ábra): a membrán megnyúlásán túl a sejt belső vázrendszerének is át kell épülnie, hogy a sejt körül ölelhesse a bekebelezendő objektumot. Az útvonal komponensei a CED-10 (Rac GTPáz homológja) aktivitását szabályozzák, mely az aktin citoskeleton átrendezésért felel a bekebelezés során (Reddien és Horvitz, 2004). Az útvonal a PS közvetítette „eat me” jel hatására aktiválódik, melyet a humán PS receptor homológ PSR-1, illetve az integrin útvonal receptora, az INA-1/PAT-3 (egyszerűsítés kedvéért csak az INA-1 lesz említve a következőkben) ismer fel (Hsu

és Wu, 2010; Wang és mtsai., 2003). Ezek mellett egy harmadik, nem elhanyagolható receptor aktivitása is fontos, mely egyben a Wnt útvonalat is köti a folyamathoz: ez a Frizzled homológ MOM-5 (more of MS 5), melynek „eat me” szignálja még nem ismert (Cabello és mtsai., 2010). Mindhárom esetben a CED-2, CED-12, CED-5 hármassal alkotott komplex aktiválódik, mely komplex a CED-10 GEF-je. A PSR-1 receptor közvetítette szignalizációkor a CED-12 kapcsolódik a receptorhoz (kapcsolatukat kimutatták élesztő kéthibrid rendszerben (Wu és mtsai., 2001), míg az INA-1 esetében a fent említett SRC-1-en keresztül a CED-2 kapcsolódik a receptorhoz (Hsu és mtsai., 2010), majd toborozzák oda a komplexükhöz szükséges többi komponens.



17. ábra. Az apoptotikus bekebelezés molekuláris modellje *C. elegans*-ban (Wormbook nyomán)

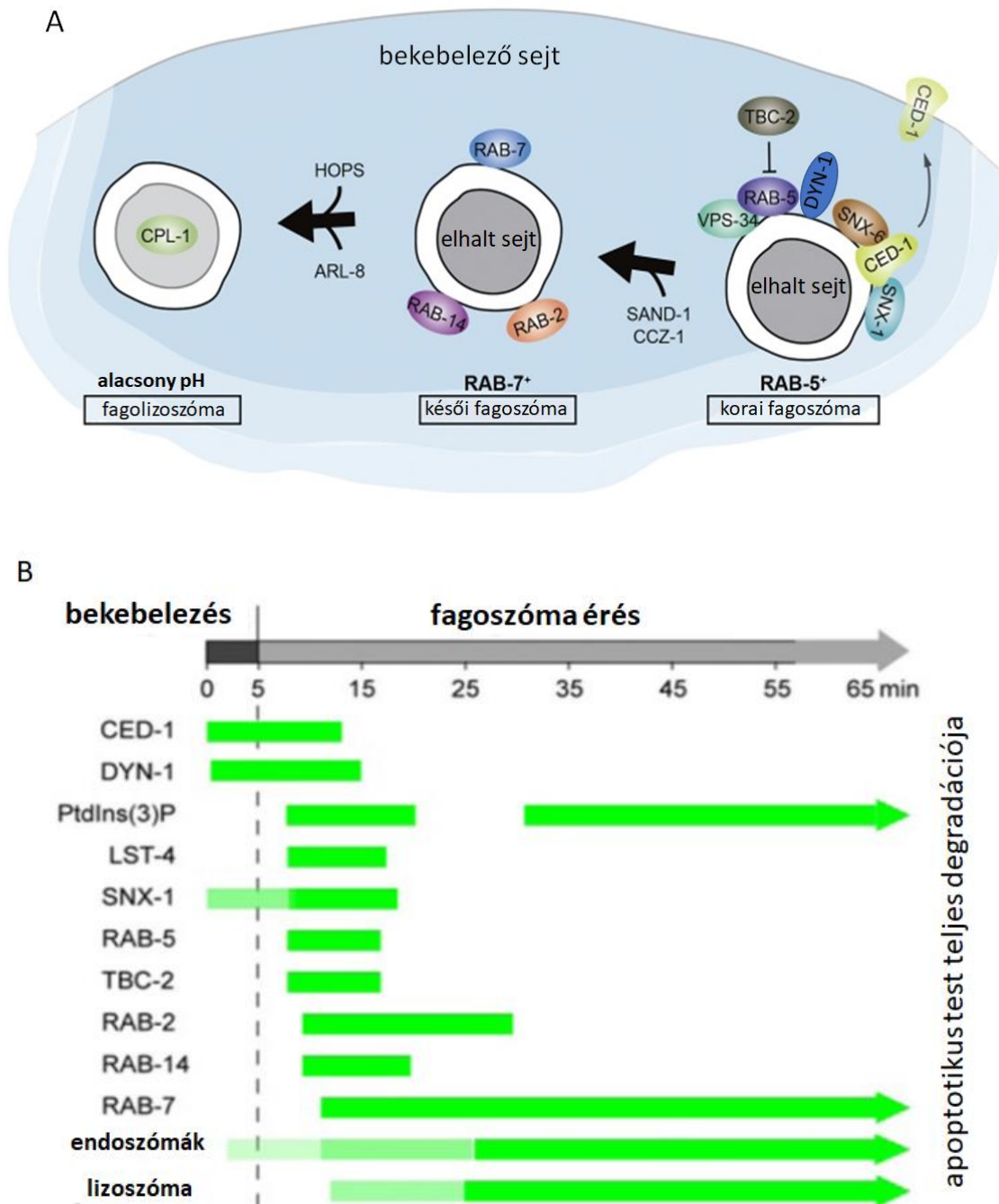
Csak a főbb útvonalak és komponensek lettek feltüntetve.

A bekebelezés folyamatát két, részben átfedő útvonal befolyásolja, melyeket mai tudásunk szerint 3 fő receptor aktivál, amiket az „eat me” szigálként azonosított PS (pirossal jelölve) hoz működésbe. Az egyik útvonalban a CED-1 receptor a CED-7-el karöltve vesz részt a PS, ill. esetlegesen még nem azonosított „eat me” szignál közvetítette apoptotikus sejt felismerésben. Ha ez megtörtént, a CED-6 továbbítja a jelet, ezzel beindítva a bekebelezés folyamatát: részben a CED-10 működésén keresztül hat, de nagyobb arányban a DYN-1 által vezérelt membránnövekedést indukálja. A másik útvonalban a PSR-1 és az INA-1 receptorokon keresztül történik meg a PS felismerése, melyek eltérő módon végül a CED-2, CED-5, CED-12 komplexet aktiválják, ami a CED-10 működését látja el energiával, ezzel a sejtvez

átrendezését biztosítva a bekebelezéshez. Nagy eséllyel további, még nem azonosított „eat me” szignálok, és receptorok és kapcsolatukat segítő segédfehérjék is részt vesznek a folyamat finomhangolásában.

A fagoszóma zárásában a PtdIns(3)P és annak kinázai (PIKI-1 (phosphoInositide-3-Kinase) és VPS-34 (Vacuolar Protein Sorting)) és foszfatáza vesz részt (Kinchen és mtsai., 2008; Yu és mtsai., 2008). Amint kialakult a fagoszóma, el is indul annak érése (18. ábra). A fagoszóma felszínén lévő CED-1 receptorok újrahasznosításra kerülnek: a plazmamembránhoz való transzportjáért a szortírozó nexinek (SNX-1 (Sorting NeXin) és SNX-6) felelnek. Ezek a fehérjék a retromer komplex részeként a transzmembrán receptorok és egyéb transzporttal kapcsolatos fehérjék visszanyerésében vesznek részt (Verges, 2007). Amint a fentiekben említésre került, a DYN-1 fontos szerepet játszik a fagoszóma érésének kezdeti lépéseiben is a membrán folyamatok szervezőjeként (18. ábra). A VPS-34, a RAB-5 és a RAB-7 fehérjéken keresztül vesz részt az endoszómák és lizoszómák toborzásában, és azoknak a fagoszómával való fúziójukban (He és mtsai., 2010; Kinchen és mtsai., 2008; Yu és mtsai., 2008). A membrán-kötött, GTP-vel ellátott RAB fehérjék adott organelum más organelummal, vagy membránnal való fúzióját segítik. A RAB-5 -mint korai endoszóma marker- a fagoszóma és a korai endoszómák fúzióját segíti, ezzel elősegítve annak érését (Kinchen és mtsai., 2008; Kitano és mtsai., 2008). Toborzását a DYN-1 mellett a VPS-34 is segíti; ez a kapcsolat kölcsönös, a RAB-5 a VPS-34 toborzásban is részt vesz, így kialakítva egy pozitív regulációs ciklust (Kinchen és mtsai., 2008). A RAB-5 csak egy ideig található meg a fagoszóma felszínén, amint ellátta funkcióját, leválik a fagoszómáról (He és mtsai., 2010), melyhez többek között egy RAB GAP, a TBC-2 (Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family) funkciója szükséges (Li és mtsai., 2009). A RAB-5 pozitív korai fagoszóma és a RAB-7 pozitív késői fagoszóma közötti átmenetet a SAND-1 (SAND - Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1 - endocytosis protein family) és CCZ-1 (yeast CCZ (Caffeine, Calcium, Zinc sensitive) homolog) alkotta komplex biztosítja (Kinchen és Ravichandran, 2010), a RAB-5 leválasztásán ill. a RAB-7 toborzásán keresztül. Az érés késői szakaszában tehát a RAB-7, ill. más kis GTPázok, a RAB-2 és RAB-14 jelenik meg a fagoszóma felszínén (Yu és mtsai., 2008). Utóbbi kettő a RAB-5-höz hasonlóan tranziensen jelenik meg a fagoszómán, míg a RAB-7 egészen az elhalt sejt eliminálásáig megmarad (Guo és mtsai., 2010; He és mtsai., 2010; Yu és mtsai., 2008). A RAB-2 és RAB-14 vélhetően redundáns módon látják el a fagoszómák lumenjének elsavasítását (ami fontos lépés a fagoszóma érésében, ugyanis a lizoszóma enzimeit savas közegben fogják ellátni funkciójukat), ill. a lizoszómák fagoszómákhoz való toborzását és megkötését, míg a RAB-7 a két organelum fúziójáért felel (Guo és mtsai., 2010), melynek effektora a HOPS (homotypic

fusion and protein sorting) komplex, ami hat alegységből (VPS-11, 16, 18, 33, 39, 41) épül fel. A komplex bármely tagjának inaktivitása esetén sérül az apoptotikus test lebontása (Kinchen és mtsai., 2008). A VPS-41 és a lizoszóma-lokalizált kis GTPáz ARL-8 (ARF-like 8) kapcsolata is ismert, mely interakció adja a lizoszóma-fagoszóma fúzió folyamatának egy részét (Sasaki és mtsai., 2013). A fúziót követően kialakul a fagolizoszóma, melyben az elhalt sejt végérvényesen lebontásra kerül, amit a lumen savas közege mellett a CPL-1 (cathepsin-like 1) proteáz funkciója segít (Sasaki és mtsai., 2013).



18. ábra. A fagoszóma érése, és az apoptotikus test degradációja *C. elegans*-ban (Conradt és mtsai., 2016; Lu és mtsai., 2012 nyomán)

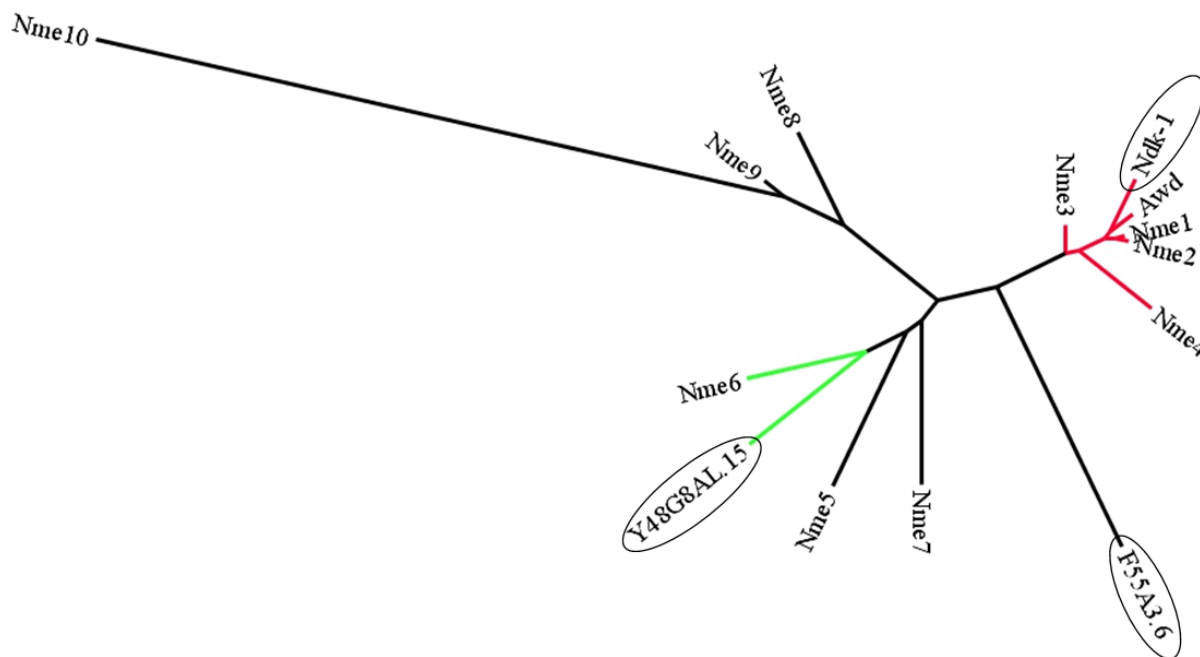
A: A fagoszóma érésében és degradációjában szerepet játszó főbb fehérjék és lokalizációjuk látható. Az érési folyamat több lépésből áll, melyek jól elkülöníthetők a rájuk jellemző fehérjék megjelenésével. A korai lépéskor a CED-1, DYN-1, RAB-5 és PIKI-1 jelennek meg a fagoszóma felszínén, majd ezt követően a késői fagoszómán a RAB-2, RAB-7 és a RAB-14 jelennek meg. Közülük a RAB-5, RAB-7 és PIKI-1 toborzásáért a DYN-1 felel, mely fontos szereplője a membránfolyamatok szervezésének. Ezek az egymásra épülő fázisok vezetnek végül az endoszómák és a lizoszóma toborzáshoz, ill. az azokkal való fúzióhoz.

B: A bekebelezés, fagoszóma érés és az apoptotikus testek degradációja mindösszesen nagyságrendileg egy órát tesz ki. A „0” perc jelöli a bekebelezés kezdetét, míg az 5 percnél látható szaggatott vonal annak végét; innentől a fagoszóma éréséről beszélünk. A folyamatban résztvevő molekulák a pszeudopodok ill. a fagoszóma felszínén való megjelenésük sorrendjében fentről lefelé találhatók az ábrán, míg időbeni expressziójuk zölddel jelölt, sötétebben jelölve azt az intervallumot, amikor jelenlétük kifejezettebb.

Az apoptotikus sejtek bekebelezése, és sejten belüli degradációja megakadályozza az elhaló sejtek káros (bel)tartalmának külvilágba jutását, így elkerülve gyulladásos és autoimmun folyamatok beindulását. Ez különösen fontos annak tekintetében, hogy szervezetünkben nagyságrendileg napi 200-300 milliárd sejt turnover történik meg, melyek jelentős része apoptotizál (Arandjelovic és Ravichandran, 2015). Az apoptotikus testek ennek ellenére alig detektálhatóak fiziológiás körülmények között. A fagociták a károsodott sejtek bekebelezésén túl sok esetben gyulladásgátlókat (pl. TGF- β , IL-10, PGE2) bocsájtanak ki a bekebelezés során (Morioka és mtsai., 2018). Azonban, ha a bekebelezés folyamata, vagy a gyulladásgátlók kibocsájtása valamilyen módon sérül, és eltakarítatlan apoptotikus testek jelennek meg /halmozódnak fel szervezetünkben, az patológiás folyamatokhoz (fertőzések, gyulladás, autoimmunitás és rák) vezet.

4 Előzmények

A *C. elegans* genomjában három NDPK paralógot azonosítottak (Bilitou és mtsai., 2009): ezek az ORF (open reading frame)-ek az F25H2.5, az F55A3.6 és az Y48G8AL.15 (19.ábra). Utóbbi kettő divergáltabb az első csoporttól (NME1-4), míg az F25H2.5 nagy szekvencia hasonlóságot mutat az első csoport tagjaival, különös tekintettel az NME1 és NME2-re (20./A ábra), így csoportunk behatóbban ezzel a génnel kezdett el foglalkozni, melynek az *ndk-1* (nucleoside diphosphate kinase-1) nevet adtuk (Masoudi és mtsai., 2013).



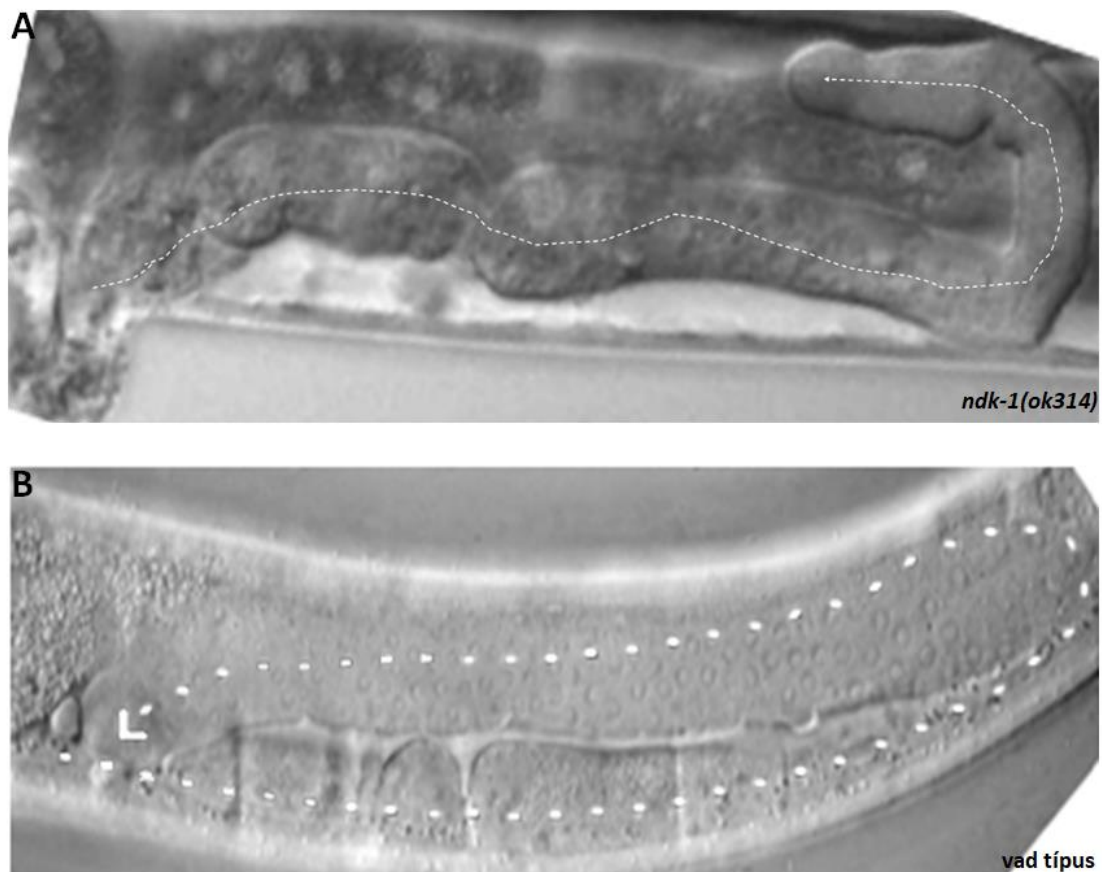
19. ábra. Az emberi és a *C. elegans* NME homológok viszonya (Farkas, 2011 nyomán).

A fán jól elkülönül az 1-es csoport (NME1-4, pirossal kiemelve) a 2-estől. Az NDK-1 a *Drosophila* Awd-hez hasonlóan az első csoport első két tagjával mutat szoros kapcsolatot, az F55A3.6 a két csoport között helyezkedik el, míg az Y48G8AL.15 az NME6-tal mutat rokonságot. Fontos megjegyezni, hogy szekvenciaanalízis alapján mindhárom ORF rendelkezik a kináz funkcióhoz szükséges His-el.

Az NDK-1 fehérje a humán ortológjaival nem csak nagymértékű szekvencia hasonlóságot (85%) mutat, de kitüntetett pozíciójú aminosavak, mint a kináz funkció ellátásáért felelős His¹¹⁸, ill. a multimerek összeállásáért felelős Ser¹²⁰ is konzerváltak (Mocan és mtsai., 2007; Steeg és mtsai., 2003) Csoportunk a vizsgálatokat az *ok314* deléciós mutánsal (melyet balanszáltak a könnyű fenntarthatóság érdekében (TTV1-es törzs), mivel a delécióra homozigóta állatok sterilek), ill. a teljes cDNS-t hordozó RNSi konstrukcióval kezdte meg. A főbb megfigyelt fenotípus az *ndk-1* hiányában, ill. csendesítésének hatására: sterilitás, nem teljesen kifejlődött gonád (csökkent DTC migráció), kitüremkedő vulva (Pvl-Protruding vulva), embrióletalitás (ezáltal csökkent életképes utódszám), ill. megfigyeltük az apoptotikus testek

csírasejtjei megrekednek a sejtosztódás mitotikus fázisában. Mindezek következtében a nullmutánsok sterilek (Masoudi és mtsai., 2013).

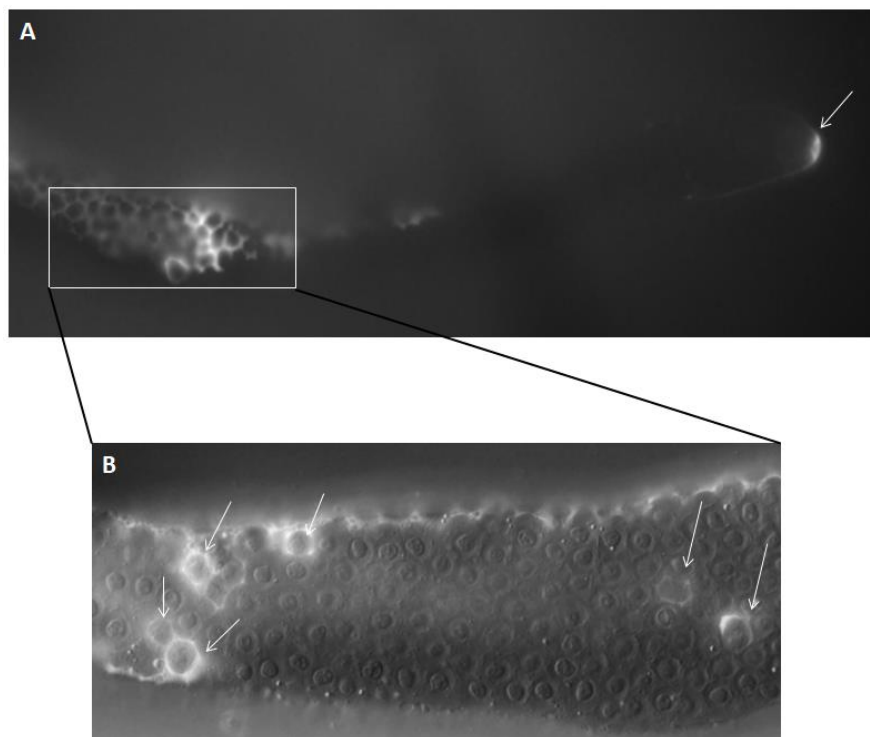
Ezután az *ndk-1* (-) mutáns DTC migrációs zavarának és a felgyülemlett apoptotikus testek mögötti bekebelezési defektusok mikéntjére kerestük a választ. Ezeknek a kísérleteknek (és az ezekből készült tanulmánynak) már aktív résztvevője voltam, illetve a későbbi munkáimnak is alapját képezték. A két, látszólag nem összefüggő fenotípust együtt lehet kezelni, mivel mindkettő esetében a sejtvázszer átrendeze, illetve a sejtfelszín növekedésének biztosításához a membránátrendezési folyamatok átszerveze a kulcs, így analóg folyamatoknak tekinthetők (Hurwitz és mtsai., 2009; P W Reddien és Horvitz, 2000; Wu és Horvitz, 1998). Az irodalomban is számos példa mutatja, hogy az apoptotikus bekebelezésben fontos gén a sejt migrációban is érintett, sőt *C. elegans*-ban DTC vándorlási fenotípust is mutatnak, mint például a *dyn-1*, *mom-5* (More Of MS), *ced-10* (Cabello és mtsai., 2010; Cram és mtsai., 2006; Peters és mtsai., 2013). Az *ndk-1* (-) mutánsok gonádkarjai a vad típusú „U” alakkal szemben inkomplett migráció következtében csak „J” alakúak (21. ábra).



21. ábra. Az *ndk-1* (-) mutánsok gonádkarja (Fancsalszky és mtsai., 2014 nyomán)

Az *ndk-1* nullmutánsok DTC migrációjának zavara következtében inkomplett, „J” alakú gonádkarok alakulnak ki (A), míg a vad típusú gonádkarok „U” alakúak (B).

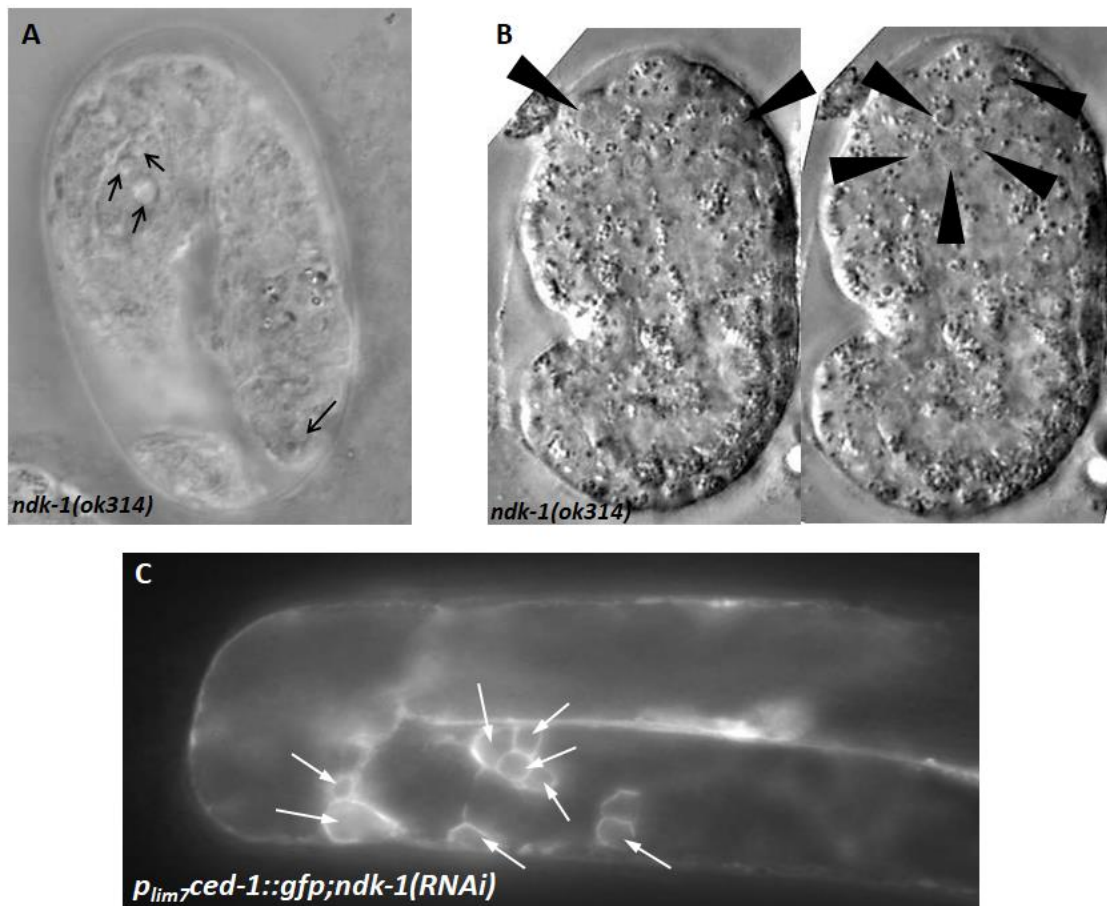
Az *ndk-1* nullmutánsok „J” alakú gonádkarjai az inkomplett DTC migráció következtében alakul ki, melyek a migráció harmadik (vagy dorzális) fázisában állnak meg. Ahogy azt korábban láthattuk, ebben a fázisban az integrinek szerepe meghatározó, így az útvonal tagjaival episztázis analízist végeztünk, mely eredménye azt mutatta, hogy az NDK-1 a CED-10-től downstream, illetve az integrin útvonallal párhuzamos ABI-1 (ABI Interactor homolog)/ABL-1 (related to oncogene ABL)-gyel parallel (azaz jó eséllyel a ced-10 útvonalban) hat (24. ábra) (Fancsalszky és mtsai., 2014). Az NDK-1 DTC migrációbeli érintettségével egybevág, hogy az NDK-1 transzlációs riporter kifejeződik ezekben a sejtekben (22. ábra). Kiemelendő, hogy az NME géncsalád metasztázis szuppresszor hatásával szemben az NDK-1 hiányában a migráló sejtek (DTCK) motilitása csökken. Ezért megvizsgáltuk, hogy hasonló körülmények között hogyan viselkedik az NDK-1: egy invazív emlőkarcióma sejtvonalba transzfektálva ugyanúgy csökkentette a sejtek migrációs potenciálját, mint a humán NME1 és NME2 (Fancsalszky és mtsai., 2014). Így az eltérő funkció következhet az eltérő környezettől is, ill., amint az a tézisben a saját eredmények között bemutatásra kerül, az NDPK-k megfelelő dózisa is kulcsfontosságú.



22. ábra. Az NDK-1::GFP fúziós fehérje kifejeződése a DTC-ben és a gonád toksejtjeiben (Fancsalszky és mtsai., 2014 nyomán)

A TTV3-as transzgenikus törzsben megfigyelhető az NDK-1::GFP - melyet integráltan hordoz–expressziója a DTC-ben (A ábra, fehér nyíllal jelölve), illetve a gonád specializált bekebelező sejtjeiben, a toksejtekben, melyek a gonád kanyarodó régiójában apoptózissal elhaló csírasejteket kebelezik be (nagyított, B részlet, az apoptotikus sejtek fehér nyíllal jelölve, melyeket az NDK-1-et expresszáló toksejtek vesznek körbe).

Az *ndk-1* hiányában, ill. RNSi csendesítésének következtében megfigyelhető eltakarítatlan apoptotikus testek felhalmozódása az apoptotikus bekebelezés folyamatának vizsgálatára irányította figyelmünket (23. ábra). Elgondolásunkat alátámasztotta, hogy a gonád apoptózissal elhaló csírasejtjei körüli specializált bekebelező sejtekben, a toksejtekben is kimutattuk az NDK-1 jelenlétét (22. ábra). Episztázis analízis alapján itt is elmondható, hogy az NDK-1 a CED-10-től downstream, és az ABI-1/ABL-1-el párhuzamosan hat (24. ábra). Ráadásul genetikai interakciót figyeltünk meg az *ndk-1* és *dyn-1/dynamin* között: a kettősmutánsok nem életképesek (Fancsalszky és mtsai., 2014), illetve ugyan különböző penetranciával, de az *ndk-1* (-) és *dyn-1* (-) egyszeres mutánsok hasonló fenotípust mutatnak (23. ábra). Fontos megjegyezni, hogy ez az első tanulmány, mely az NDPK-kat az apoptotikus bekebelezés folyamatához társítja.

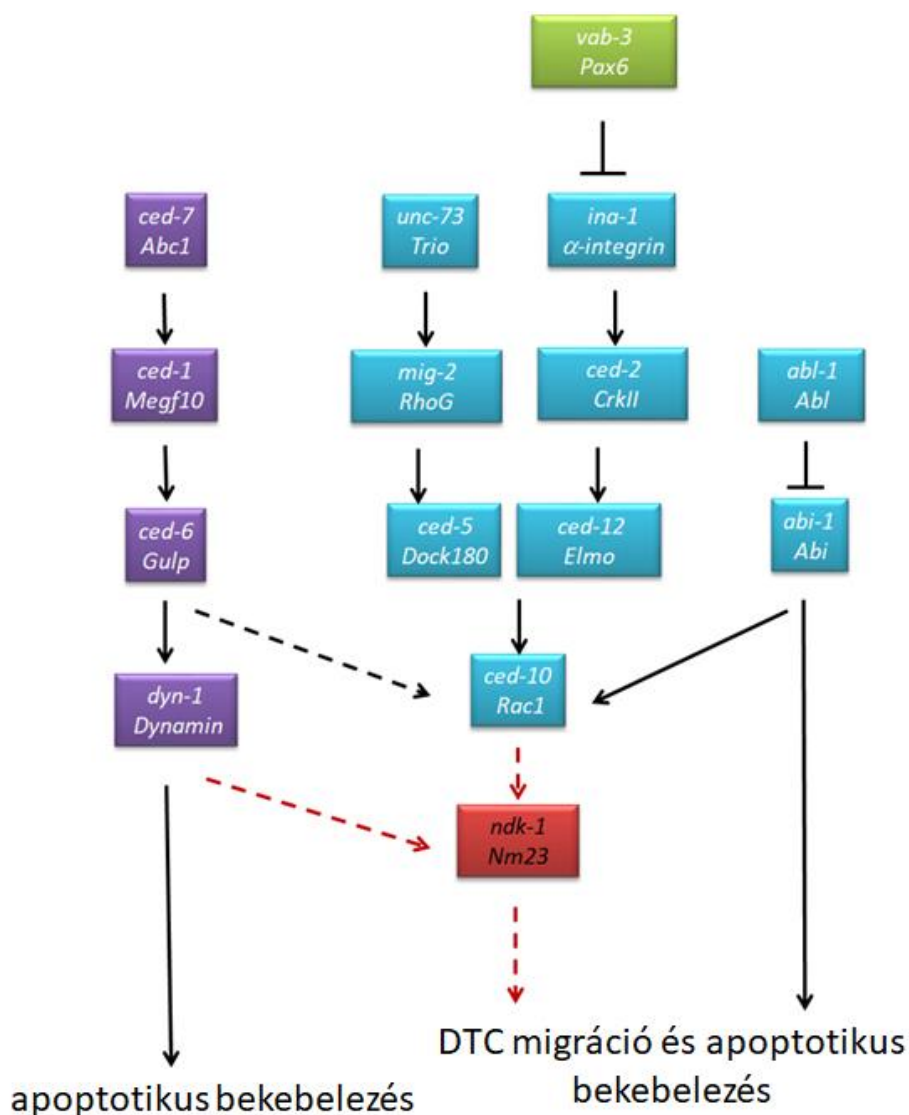


23.

ábra. Az *ndk-1* apoptotikus bekebelezéshez köthető fenotípusai (Fancsalszky és mtsai., 2014 nyomán)

A: az *ndk-1* (-) a *dyn-1* (-) mutánshoz hasonló fenotípust mutat: késői embrióletalitás, eltakarítatlan apoptotikus testekkel. **B:** Az apoptotikus testek felhalmozódása *ndk-1* (-) embrióban. **C:** A *C. elegans* gonádjának kanyarodó régiójában figyelhető meg a csírasejt egy részének apoptózisa. Mivel ez már a csírasejt osztódásának meiotikus szakaszában történik, és az *ndk-1* (-) mutánsok csírasejtjei megrekednek a mitotikus fázisban, így a gyengébb fenotípust okozó, *ndk-1* RNSi-val való csendesítéskor tudtuk megfigyelni az apoptotikus csírasejt felhalmozódását, melyet fluoreszcens markerrel (*P_{lim-7}ced-1::gfp*) jelöltünk.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy mind a DTC migráció, mind az apoptotikus testek bekebelezésében az NDK-1 fontos szerepet tölt be (24.ábra), melyet a háttérben zajló folyamatok (citoszkeleton átrendezés, membránfolyamatok szabályzása) végső lépéseinél lát el, valószínűsíthetően a DYN-1-el való kapcsolatán keresztül, mely egy újabb bizonyítéka lehet a két fehérje különböző modellrendszereken átívelő együttműködésére.



24. ábra. Az *ndk-1* elhelyezkedése az apoptotikus bekebelezés, és a vele analóg DTC migrációjának folyamatában (Fancsalszky és mtsai., 2014 nyomán)

A CED-10 útvonal és az ABI-1/ABL-1 szignalizáció mindkét folyamatban részt vesz (kékkel jelölve), míg a velük párhuzamos CED-1 útvonal fő ága (lilával jelölve) kizárólag a bekebelezés folyamatában érintett. Eredményeink alapján az NDK-1 (pirossal kiemelve) mindkét folyamatban a CED-10-től downstream helyezkedik el, illetve az apoptotikus bekebelezés folyamatában genetikai interakciót mutat a CED-1 útvonal effektorával, a DYN-1-el.

Az NDPK-k upstream regulációjáról jelenleg hiányosak az ismereteink (ld. a korábbi „NME-k szerepe a metasztázisban” c. fejezetben), így azt sem tudjuk, hogy tumorokban (pl. invazív emlőkarcinómában) hogyan mérséklődik az expressziójuk. Egy nemrég megjelent tanulmányban (Tran és mtsai., 2019) egy fontos, a *C. elegans ndk-1* szabályzását érintő felfedezést tettek: a gén 3' UTR régiójában a miR-35 miRNS kötőhelyét találták. A miR-35 más miRNS-ekhez hasonlóan posztranszkripciós szinten szabályozza célgénjeit, deadenilálva azok mRNS-ének 3' UTR régióját, ezzel a transzkriptum destabilitását, transzlációjának gátlását, illetve a P-granulumokhoz (melyek a szomatikus P-testekhez hasonló, a *C. elegans* csíravonalra jellemző specializált, RNS regulátor argonautákat felhalmozó képletek) való transzlokációját okozza. Kísérleteikben a genotoxikus stressz által kiváltott csíravonal apoptózis folyamatát vizsgálták a *C. elegans* gonádjában, ahol kimutatták, hogy a miR-35 az NDK-1-en keresztül tartja féken a MAPK útvonal aktivációját. A genotoxikus stresszt (besugárzás) követően a miR-35 (-) mutánsok elhaló csíravonal sejtekben megnövekedett az NDK-1 expressziója, mely hatására a MAPK útvonal hiperaktiválódott, ezzel a sejtek halálát okozva (Tran és mtsai., 2019).

5 Célkitűzések

Doktori munkám célja a *C. elegans* NDK-1 és humán ortológja, az NME1 biológiai funkcióinak jobb megértése, illetve az NDPK-k által közvetített metasztázis gátló folyamatainak feltárása, ezek közül kiemelten fókuszálva a sejtmigrációban, illetve a programozott sejthalálban betöltött szerepükre. Mindkét folyamat kulcsfontosságú lehet az áttétképződés megakadályozásában, mivel a mai napig nem tudjuk, hogy az NDPK-k pontosan hogyan látják el metasztázis szuppresszor szerepüket. Emiatt egyre többen, egyre széleskörűbb technikákkal és modellekkel igyekeznek feltárni a géncsalád funkcióit, ill. molekuláris szintű szerepüket. Így a kezdeti, többnyire humán sejtvonalas rendszerek mellett ma már esetmuslicában, zebrahalsban, egérben, és karmosbékában is folynak ilyen irányú vizsgálatok. Csoportunk pedig a *C. elegans ndk-1* gén fejlődésbiológiai szerepének vizsgálatával foglalkozik, hogy jobban megismerhessük az NME-k rákos sejtek osztódására és metasztatikus potenciáljának csökkentésére gyakorolt hatását. Több ilyen folyamatot is vizsgálunk (mint a sejt-vándorlás, ill. az apoptotikus sejtek bekebelezése), melyeket immár humán ill. egér sejtvonalakra is kiterjesztettünk.

A sejtmigráció jelenségét tekintve arra figyeltünk fel - ahogy az irodalmi áttekintésben is bemutattam - hogy általában a metasztatikus sejtekben csökkent NME1 szintet mérnek. Azonban az *ndk-1* (-) nullmutánsban csökkent migrációt figyeltünk meg. Mivel ez ellentmond a metasztázis szuppresszor hatás eddigi felfogásának, eredetileg az eltérő környezetet (organizmust) gondoltuk az eltérés okának, azonban az előzményekben megemlített, az NDK-1-et kifejező humán invazív emlőkarcinóma sejtvonal motilitásának csökkenése rávilágított, hogy máshol kell keresnünk a választ (mivel itt a humán ortológjainak megfelelő fenotípust adta). Az irodalmat átnézve *Drosophilában* találtunk erre utaló támpontot, miszerint a bordersejtek migrációja AWD hiányában és túltermeltetésekor is megszűnik, míg egy bizonyos köztes AWD szintnél migrálnak. De fontos megjegyezni, hogy ez a migrációt elősegítő szint alacsonyabb, mint az epitéliumból való kiválásuk előtti „alapszintű” AWD mennyiség, amikor is még polarizáltak a sejtek. Mivel ez egy fontos eredmény, amelyre valahogy a szakma eddig nem figyelt fel, egyik fontos célom volt ennek, a migrációt befolyásoló dózisfüggésnek az igazolása *C. elegans*-ban, hogy lássuk, univerzálisnak mondható-e ez a jelenség.

Az apoptotikus bekebelezés folyamatával kapcsolatban pedig egyrészt az NDK-1 molekuláris szintű szerepének feltárása a célunk, ill. a folyamatban betöltött szerepének konzerváltságát vizsgálánánk humán és egér ortológok monitorozásával a megfelelő emlős sejtvonalakban. Ill. az előző, dózisfüggő kirakóshoz egy olyan darabkát is hozzátennénk,

melyben megnézzük, hogy humán makrofágok fagocitikus kapacitása hogyan változik az NME1 ill. NME2 túltermelésekor.

Bár az NDPK-knak többféle folyamatban, jelátviteli útvonalban tulajdonítanak szerepet, számos kölcsönható fehérje partnerüket jósolták meg, ill. származik *in vitro* és *ex vivo* rendszerekből, de ezek közül kevés nyert *in vivo* modellben is megerősítést. Ezért mi *C. elegans*-ban, *in vivo* keressük az NDK-1 -ezáltal potenciálisan más NDPK-k – kölcsönható partnereit.

6 Anyagok és Módszerek

6.1 Felhasznált sejtek, sejtvonalak:

THP-1 humán monocita sejtvonal

U937 humán monocita sejtvonal

HEK-293 humán embrionális vese-eredetű sejtvonal (transzfekciós kontroll)

Egér monocitákból differenciáltatott makrofágok

Humán monocitákból differenciáltatott makrofágok

Felhasznált *C. elegans* törzsek:

Vad: Bristol (N2) (Brenner, 1974)

BC12969: *dpy-5(e907) I; sIs12774[rCesF25H2.5::GFP + pCeh361]*

TTV1: *ndk-1(ok314) I/hT2[bli-4(e937)let-?(q782) qIs48](I;III)*

TTV2: *eluEx1[NDK-1::gfp; unc-119(+)];unc-119(ed3)III*

TTV3: *eluSi1[NDK-1::GFP + cb-unc-119(+)]III*

Time-lapse mikroszkópiához: **eluEx1**[*P_{ced-1}NDK-1::mCherry; P_{ced-1}DYN-1::GFP; unc-119(+);unc-119(ed3)III*]

Menekített: *ndk-1(ok314);ndk-1(+)* (*pndk-1::NDK-1::GFP*)

Általam, ill. a közreműködésemmel előállított törzsek:

ex *p_{hsp-16.2}NDK-1::mCherry*

KT1 (*ndk-1(H118N)::GFP, unc-119(+)*) X ; *unc-119(ed3) III*

KT2 (*nm23-H1::GFP, unc-119(+)*) X ; *unc-119(ed3) III*

KT3 (*nm23-H1 (H118F)::GFP, unc-119(+)*) II ; *unc-119(ed3) III*

6.2 Törzsfenntartás

A *C. elegans* törzseket laboratóriumi körülmények között NGM (Nematode Growth Medium) lemezen tartjuk 15 és 25°C között (Brenner, 1974). Az NGM petri lemezekbe öntött agar, melyen a fonálférgek tápláléka az *E. coli* (OP50-es) auxotróf baktérium törzs. Az NGM lemez összetevői: NaCl 3g, agar 17g, pepton 2,5g, koleszterol (5mg/ml EtOH-ban) 1ml, ddH₂O 975ml. Sterilizálást (autokláv) követően a 60°C-ra hűlt médiumhoz további összetevőket adunk: 1M CaCl₂ 1ml, 1M MgSO₄ 1ml, 1M (pH6) KH₂PO₃ 25ml.

Az állatokat egyesével platina tű segítségével, nagyobb mennyiségben agarkockák áthelyezésével vagy lemosással helyezzük át friss NGM lemez(ek)re. A törzseket hosszú távon folyékony nitrogénben fagyasztva tároljuk.

6.3 Az NDK-1 / DYN-1 kapcsolatának kimutatása ko-immunoprecipitációval

A ko-immunoprecipitációt (Rocheleau és mtsai., 1999) szerint végeztük el. A TTV3 és N2 törzs kevert életkorú állatok lízis pufferben - 25 mM HEPES NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1mM DTT, 0.5% TritonX-100, 1mM EDTA NaOH, és proteáz inhibitor koktél tabletta (Roche) - felvett tenyészetét külön-külön homogenizáltuk késes Ultra-Turrax homogenizátorral. A fonálféreg extraktumokból az NDK-1::GFP-t 2 µg monoklonális anti-GFP antitesttel (3E6, Q-BIOgene) fogtuk ki. Az így kinyert komplexekben a DYN-1 jelenlétét immunoblottal mutattuk ki, anti-DYN-1 poliklonális antitesttel (Z. Zhou által küldött antitest, 1:1000-ben hígítva). Végül AP-konjugált másodlagos anti-nyúl antitesttel (Sigma-Aldrich) detektáltunk, a rendszerhez NBT/BCIP szubsztrátot adva (1:50, Sigma-Aldrich).

6.4 Az NDK-1/DYN-1 kapcsolatának kimutatása immunoprecipitációval és tömegspektrometriával (Zheng Zhou csoportja végezte)

Vegyes életkorú, vad típusú *C. elegans*-okat NETN lízispufferben (50mM Tris/pH 7.5, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, és 0.5% NP-40) homogenizáltak (gyöngyökkel), majd tisztították (ultraspin: 100kg, 20 perc, 4°C). Ezután 5 µg tisztított poliklonális anti-DYN-1 (He és mtsai., 2010) vagy kontroll antitestet (tisztított poliklonális CED-2) adtak a lizátumhoz, melyet 1 órán át inkubáltak 4°C-on, majd tisztítást követően (ultraspin: 100kg, 20 perc, 4°C) 20 µl agaróz gyöngyöt (protein-A) adtak a lizátumhoz, amit inkubációt (1 óra, 4°C) és mosást követően (NETN, 3-szor) 4-20%-os előregyártott Novex Tris-Glycine gélen megfuttattak, majd a futást követően "Coomassie brilliant blue" festékkel megfestettek. A gél feldarabolása (4 db/oszlop) és beoldása után 100 ng tripszinnel emésztették a mintákat, majd 100%-os acetonitrillel kezelték, végül szárították (Speed-Vac). A peptideket 5%-os metanolban oldották, és oszlopokra töltötték (BioBasic C18). Ezután Thermo-Finnigan LC/LC-ESI-LTQ rendszerben adat-függő módon elvégezték a tömegspektrometriát, a peptideket a *C. elegans* refSeq (NCBI) adatbázisa alapján azonosították a „Proteome Discoverer 1.4” program használatával, melyet a Mascot algoritmus szerint futtattak. Az így kapott peptidek szűrését követően a DYN-1 lehetséges interakciós partnereinek listája letétbe került a ProteomeXchange konzorcium-nál (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>), az MSV MSV000081868 azonosító alatt.

6.5 Az NDK-1 / DYN-1 kapcsolatának kimutatása DPLA (Duolink *in situ* proximity ligation assay) módszerrel

Ahhoz, hogy az NDK-1/DYN-1 egy komplexben való jelenlétét kimutassuk molekuláris szinten, a DPLA módszert alkalmaztuk (Söderberg és mtsai., 2006)-nak, illetve a gyártó (Olink Biosciences) instrukcióinak megfelelően. A módszer lényege, hogy a vizsgálni kívánt két fehérjét *in situ*, szövet/sejtmintákban vizsgálhatjuk, melyeket olyan specifikus antitesttel jelöljük, amiket különböző fajokban termeltettek (a mi esetünkben egér anti-GFP, és patkány anti-DYN-1). Ezeket a fajspecifikus antitesteket felismerő, a KIT-hez adott másodlagos antitesteket adjuk a rendszerhez, melyekhez speciális DNS oligo szakaszokat kötöttek. Ha a két vizsgált fehérje közel van egymáshoz (KIT-től függően 30-40nm), akkor ezek a DNS szakaszok a rendszerhez adott további, „hibridizációs konnektor oligókkal” és ligáz enzim közreműködésével cirkuláris DNS-é állnak össze. Ezután „rolling circle” amplifikációval felszaporítjuk a cirkuláris DNS-t. Végül a rendszerhez detektáló oldatot adunk: a Cy3-al jelölt hibridizációs próbák kötnek a felszaporított DNS-hez, mely jel fluoreszcens mikroszkóppal jól detektálható.

A TTV2 törzsből *Bleach*-oldattal (2,5ml Hypo, 1,5ml 5M NaOH, 1ml biH₂O) nyert embriókat tárgylemezre helyeztük, fagyasztva-törtük, majd acetonnal fixáltuk, ezt követően az elsődleges antitestekkel inkubáltuk: anti-GFP (Merck MAB 3580, 1:500-as hígításban) és anti DYN-1 (Zhou labor, 1:200-as hígításban). Az Olink Biosciences rövid DNS oligonukleotidokkal jelölt másodlagos antitestjének hozzáadása után a gyártó protokollja szerinti hibridizációs, ligációs és amplifikációs lépéseket végeztük el, melyek után a rendszerhez adott Cy3 marker fluoreszcens jelét (ez a DPLA jel) mikroszkóppal detektáltuk, ahol kizárólag a comma stage állapotú embriókat értékeltük, mivel ebben az állapotban zajlik a legintenzívebben az apoptózis az embriókban.

6.6 Az NME1 / DYN2 kapcsolatának kimutatása DPLA (Duolink *in situ* proximity ligation assay) módszerrel (Mathieu Boissan csoportja végezte)

A két fehérje kapcsolatának kimutatása humán makrofágokban az előzőekhez hasonlóan történt, csupán az első lépésekben (fixálás és eltérő elsődleges antitestek használata) van különbség. A tárgylemezen növesztett makrofágokat metanollal fixálták, és az alábbi elsődleges antitestekkel inkubálták: poliklonális nyúl anti-dynamin-2 (Dr. P. De Camilli (Yale University School of Medicine, New Haven, CT)) és monoklonális egér anti-NME1 (Origene).

6.7 Az NDK-1 / DYN-1 kapcsolatának kimutatása time-lapse mikroszkópiával (Zheng Zhou csoportja végezte)

Az általuk kifejlesztett time-lapse fluoreszcens mikroszkópiás képalkotással vizsgálták az élő *C. elegans* embriókban lezajló bekebelezési és az azt követő fagoszómaérés folyamatait (Z. Li és mtsai., 2013). Comma stage embriókat (ebben az állapotban zajlik a legintenzívebben az apoptózis az embriókban) azok ventrális oldala felől az apoptotikus testek eltávolításának (bekebelezéstől a lizoszómális lebontásig) 1 óráján át 2 percenként készítenek felvételeket, így jól lekövethetőek a fluoreszcensen jelölt fehérjék a fagoszómák felszínén. A mi esetünkben az NDK-1 és a DYN-1 kolokalizációját vizsgáltuk az embriogenezis alatt bekövetkező apoptotikus testek eltávolítása és az azt követő fagoszóma érés folyamatában. Ehhez olyan transzgenikus törzset állítottak elő, amely extrakromoszómálisan hordozza az NDK-1::mCherry és a DYN-1::GFP transzgéneket, melyeket bekebelező sejt specifikusan a *ced-1* promóterrel hajtottak meg.

A Zhou labor már rendelkezett a *P_{ced-1}dyn-1::gfp* konstrukcióval, ezért az általunk is számos kísérletben használt *ndk-1::gfp* konstrukcióban fluorofórt kellett cserélni. Ezt mindkét labor elvégezte, ebben a kísérletben a Zhou labor a sajátját használta fel, melyhez PCR-el felszaporították az *ndk-1* genomi szekvenciáját, amit SalI és XmaI restriktációs endonukleázokkal helyeztek be a saját vektorukba, mely már tartalmazta a *ced-1* promótert és az mCherry riportert, így létrehozva a *P_{ced-1}ndk-1::mCherry* plazmidot. A nem mozgó, Unc (uncordinated) állatokat a két konstrukcióval és az *unc-76* menekítő marker plazmiddal (pUNC76 [*unc-76*(+)])) együtt mikroinjektálták (Jin, 1999), és a mozgó állatokra szelektáltak. Az általam előállított *P_{ndk-1}ndk-1::mCherry* konstrukció elkészítése és felhasználása lejjebb, a DTC migráció dózisát érintő blokkban lesz részletezve.

6.8 Emberi vérből izolált, elsődleges monocitákból differenciáltatott makrofágok (hMDM) létrehozása (Mathieu Boissan és Florence Niedergang csoportja végezte)

Egészséges donorok véréből Ficollban (GE Healthcare) denzitás-gradiens ülepítéssel nyerték ki a PBMC-ket (Primary human Peripheral Blood Mononuclear Cell). Ezután a monocitákat adhéziójuk alapján szelektálták FCS-mentes (fetal calf serum) médiumban (RPMI médium, amihez 100 Unit/ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 2mM L-glutamint -Gibco-adtak). Az így szelektált monocitákat differenciáltatták (Dumas és mtsai., 2015; Mazzolini és mtsai., 2010)-szerint makrofágokká: 8 napig a megfelelő adhéziós médiumban inkubálták őket, melyhez 10% FCS-t és 10 ng/ml rekombináns humán makrofág kolónia stimuláló faktort (rhM-CSF; R&D systems) adtak.

6.9 Egér csontvelőből differenciáltatott makrofágok (BMDM) létrehozása (Szondy Zsuzsa csoportja végezte)

Csontvelői progenitor sejteket izoláltak 2-4 hónapos C57B6 egerek femurjából. A sejteket steril fiziológiás sóoldattal mosták, majd 5 napig 37°C-on, 5% CO₂ jelenlétében differenciáltatták DMEM médiumban, melyhez 10% FBS-t, 20% kondicionáló médiumot (L929 sejtekből származik), 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 mg/ml streptomycint adtak.

6.10 *In vitro* fagocitózis assay vizsgálat hMDM-ken (Florence Niedergang csoportja végezte)

A fagocitózis vizsgálatot üveg tárgylemezekre letapasztott makrofág sejteken végezték (Braun és mtsai., 2004). A vörösvértesteket (VVT) PBS1X oldatban mosták, majd opszonizációjukhoz anti-VVT antitestekkel inkubálták szobahőn 30 percig, mosást követően szérummentes médiumban vették föl. Az IgG-vel opszonizált VVT-k fagocitózisát követően a sejteket 4%-os PFA-val (Sigma) és 4%-os szacharóz elegyével fixálták (45 perc, 4°C), majd a bekebelezetlen VVT-k PBS és 2%-os FCS oldatában F(ab')₂ anti-nyúl IgG-Alexa Fluor 488 antitesttel lettek megjelölve (30 perc). A következőkben 0,05%-os szaponinnal permeabilizálták a sejteket, majd a megfelelő intracelluláris jelölőt (adott antitest, vagy fluoreszcens falloidin) adták hozzájuk, PBS/ 0,05% szaponin/ 2% FCS -ben. A Zymosan részecskéket szintén PBS1X oldatban mosták, és szérummentes médiumban vették föl, majd sor került fagocitózisukra.

A fagocitózist az alábbiak szerint kvantifikálták: szabadon választottak 50 makrofág sejtet, és megnézték, hogy mennyi VVT-t kebeleztek be (a fagoszómákat a fluoreszcens jel és fáziskontraszt képek alapján azonosították): ez a fagocitikus index. Az asszociáció kvantifikálását (asszociációs index) szintén szabadon választott 50 sejtrel végezték, mely során a fagocitált VVT-ken túl az adott sejt körül lévő VVT-ket is összeszámolták. Mindkét index esetében a kontroll sejteken mértékhez képest %-os arányban adták meg a mérés eredményét.

A fagocitikus kupa körüli fehérjék, és az F-aktin toborzásának kvantifikálása (Braun és mtsai., 2004)-szerint történt, ImageJ szoftver (NIH libraries) segítségével. A fagocitikus kupa és a sejtkeg körüli háttérfluoreszcenciát korrigálták, majd adott fehérje toborzási indexét a fagocitikus kupa körüli fluoreszcencia intenzitásának és a kortexben mért fluoreszcencia intenzitásának hányadosából kapták. A képeket széles látómezejű inverz mikroszkóppal (Leica DMI6000) készítették.

6.11 *In vitro* fagocitózis assay vizsgálat BMDM-ken (Szondy Zsuzsa csoportja végezte)

Az egér NME1 fagocitózisban betöltött szerepének vizsgálatához RNSi-vel csendesítették azt, és két nappal a transzfekciót követően az általuk bekebelezett apoptotikus timociták mennyiségét határozták meg. Ehhez 4 hetes C57B6 egerek csecsemőmirigyéből izolált timocitákat (10^7 sejt/ml) 1 napon át növesztettek szérummentes RPMI médiumban, melyhez 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint, 100 mg/ml streptomycint és 0,5 μ M „CellTracker deep red dye” jelölőfestéket (Thermo Scientific) adtak. Az így megjelölt timocitákhoz 1/5-nyi BMDM-t adtak, és 1 órán át inkubálták őket. Ezt követően a fel nem vett apoptotikus sejteket lemosták, és tripszinnel mobilizálták a letapadt makrofágokat, melyek közül meghatározták azoknak az arányát (Becton Dickinson FACSCalibur), melyek apoptotikus sejtet kebeleztek be.

6.12 siRNS transzfekció az elsődleges makrofágokba (Florence Niedergang és Szondy Zsuzsa csoportjai végezték)

A humán makrofágok transzfekcióját (hMDM) (Marion és mtsai., 2012)-szerint végezték. A 4-5 napos makrofágokat kétszer mosták, majd komplettált médiumban tartották 37°C-on. Az siRNS-t (240 nM végkoncentrációban) lipofektamin RNAiMAX reagens tartalmú OptiMEM médiumban (GlutaMAX tartalmú, Thermo Scientific) készítették elő, majd hozzáadták a sejtekhez, és együtt inkubálták őket. Az NME1-et célzó siRNS szekvenciája 5'-GGCUGUAGGAAAUCUAGUU-3' volt, míg a kontrol (Luciferázt célzó) szekvencia a 5'-CGUACGCGGAUACUUCGA-3' volt (Eurogentec).

Az 5 napos egér makrofágokat (BMDM) az NME1-et (ON-TARGET_{plus} SMARTpool) és a kontrollt (ON-TARGET_{plus} Non-targeting control pool) célzó RNS-el (Dharmacon) a DharmaFECT protokollja szerint transzfektálták, majd 48 órával később a begyűjtött sejtek fentebb leírt fagocitózis vizsgálatát végezték el, illetve western blottal mérték az NME1 fehérje szintjét: A BMDM sejteket 0,5% Triton X-100 tartalmú hideg lízispufferben homogenizálták. A 2 mg/ml fehérjetartalmú mintákat Laemmli pufferben forralták, majd 15%-os SDS-poliakrilamid gélen futtatták, majd Immobilion-P membránra blottolták, melyre anti-egér NME1 (Abcam) vagy β -aktin (Sigma-Aldrich) antitestet vittek föl. A fehérjesávokat Immobilion Western Chemiluminescent HRP szubsztráttal (Millipore, Budapest, Hungary) hívták elő.

6.13 NME1, NME2 és NDK-1 túltermelése humán makrofág sejtvonalakban (Orbán Tamás laborjában, Sándor Sára és Hupcsik Kornélia segítségével végeztem)

A humán és *C. elegans* NDPK-k túltermeléséhez a (Fancsalszky és mtsai., 2014)-ben használt pcDNA3.1 vektor alapú NDPK inszertet tartalmazó plazmidokat használtuk. Eleinte a THP-1 sejteket transzfektáltuk (elektroporáció) konstrukcióinkkal AMAXA Nucleofector V Kit-tel és U001-es programmal a gyártó ajánlásai és protokollja szerint, majd geneticinnel (G418) szelektáltuk a transzfektált sejteket.

Többszöri sikertelen szelektálás után a sleeping beauty (SB) transzpononos génbeviteli rendszerre váltottunk. Ehhez az NDPK szekvenciákat klónoztuk az Orbán labor által használt SB-CAG-mCherry-CAG-puro plazmidba, mely a transzpozonon belül tartalmazza a CAG promóterrel meghajtott transzgénünket, illetve egy másik CAG promóterről hajtott mCherry markert. A FLAG::NME1, MYC::NME2 és FLAG::NDK-1 szekvenciákat ugyanazokkal a Primerekkel PCR-el felszaporítva az NheI és ClaI restriktációs endonukleázokkal klónoztuk át a transzpozonos vektorba. A konstrukciókat (és velük együtt a sleeping beauty transzpozáztt tartalmazó plazmidot) a korábban megadott AMAXA KIT-tel juttattuk a THP-1 sejtekbe. Kontrollként a jól transzfektálható HEK-293 sejteket is transzfektáltuk. Később az U937, szintén makrofág sejtvonalat is transzfektáltuk, immár elektroporációval (Bio-Rad elektroporátor) (J. O. Ward, 2001)-szerint, az ELTE TTK Immunológiai Tanszékén, Bajtay Zsuzsanna és Lukácsi Szilvia segítségével. Végül egy további génbeviteli eljárást is alkalmaztunk: a „Mirus transIT-2020 Transfection Reagent” transzfekciós reagenssel vittük be a transzpozáztt termelő és az NME1 plazmidot U937 makrofágokba, ill. transzfekciós kontrollként a HEK-293 sejtekbe.

6.14 DTC migráció dóziszfüggésének vizsgálata

6.14.1 ndk-1 heterozigóták előállítása

A TTV1-es törzs az *ndk-1 ok314*-es deléziós allélját hordozza, melyet csoportunk a *hT2[qIs48]* balanszer segítségével tart fenn, ami a *C. elegans* I. kromoszómájának jobb karja (melyen az *ndk-1* lokalizálódik) és a III. kromoszómájának bal karja közötti reciprok transzlokáció eredménye (McKim és mtsai., 1993). A balanszert 3 integrált, fluoreszcens transzgénnel jelölték, melyek a garatban, az embriókban, illetve a bélben fejeződnek ki (S. Wang és Kimble, 2001), így a balanszert hordozó egyedek könnyen azonosíthatóak fluoreszcens mikroszkóp segítségével. A TTV1-es törzs állatai *ndk-1 (ok314)*-re nézve

balanszált heterozigóta állatok (*ndk-1* (-)/*hT2*), melyek utódai az alábbiak szerint oszlanak meg: 50% *ndk-1* (-)/*hT2* heterozigóta, 25% *hT2/hT2* homozigóta (mely embrionálisan letális) és 25% *ndk-1*(-) homozigóta mutánsokat szegregál. Utóbbiak fenotípusuk alapján (Pvl, sterilitás), illetve fluoreszcens jel hiányában (nem rendelkeznek a *hT2* balanszerrel) jól elkülöníthetők a heterozigótáktól.

6.14.2 *ndk-1*-et túltermelő törzs létrehozása

Az *ndk-1*-et túltermelő törzs létrehozásához először elő kellett állítani a hősokkpromóterrel meghajtott *ndk-1::mCherry* konstrukciót. Eredetileg a korábban bemutatott, time-lapse mikroszkópiás kísérlethez készítettem el az *ndk-1::mCherry* konstrukciót, melyhez a csoportunk által korábban készített, pCFJ151 (mosSCI) vektor alapú *ndk-1::gfp* konstrukcióban a GFP kazetta NotI és PacI-el való kiemésztését követően a PCR reakcióval a pGH8 (mosSCI transzgenezis marker) vektorról felszaporított mCherry inszertet ligáltuk. Ebből kiindulva építettük be a hősokk promótert tartalmazó plazmidba (pPD49.78) a teljes *ndk-1::mCherry* kazettát, melyet annak PCR-el való felszaporítását követően NheI és KpnI enzimekkel hasítottunk, és ligáltuk a hősokk plazmidba. Ezt követően biolisztikus transzformációval (co-bombardment, lsd. lejjebb) hoztuk létre az *ndk-1* túltermelésére alkalmas törzset.

Számos különböző hősokk protokollt találhatunk az irodalomban, azonban fontos megjegyezni, hogy túlnyomó részük a hőstressz okozta élethosszváltozás vizsgálatára irányul (Zevian és Yanowitz, 2014), a mi esetünkben pedig folyamatos túltermelésre volt szükség. A *C. elegans*-ok 26°C-ig életképesek, tartósan 27°C-on már nem, ill. 25°C-on már mérhető a hősokkfehérjék aktivitása, ezért a törzset folyamatosan 25°C-on tartottuk, és az mCherry aktivitás látható is volt.

6.14.3 Transzgenikus *C. elegans* törzsek előállítása Co-bombardment-tel

A biolisztikus transzformáció (köznapi nevén génpuska) egy hatékony módszer a *C. elegans*ba történő génbevitelre. Co-bombardmentkor egyszerre több plazmidkonstrukciót juttatunk az állatokba, köztük a marker, *unc-119* fehérjét kifejező konstrukciót, mely az *unc-119* (-) állatokba jutva menekíti azok paralizált fenotípusát. A szinkronizált *unc-119* mutáns állatokat nagyméretű NGM lemezekon növesztjük, melyek egész felszínükön Na22 baktériummal fedettek, mivel ezek a baktériumok egybefüggő, vastag pázsitot alkotnak, így folyamatos táplálékutánpótlást biztosítanak a paralizált állatoknak. A lövés napján egy baktérium tápanyag mentes, jégen behűtött lemezen egyenletesen eloszlatjuk a fiatal felnőtt

állatokat. Míg kiszárad a lemez, addig a már előkészített konstrukciókból (köztük az *unc-119* menekítő) összesen 20 µg linearizált DNS-t arany szemcsékre kötünk, majd génpuskával az állatokkal sűrűn borított lemezre lőjük. A transzformáció után 4-6 nappal lehet szelektálni az *unc-119* menekítő konstrukciót hordozó vad típusú, mozgó F1 állatokra, melyek jó eséllyel a konstrukciónkat is tartalmazzák. A szelekciót segíti, hogy az *unc-119* (-) állatok mozgásképtelenségükből adódóan hamarabb elpusztulnak, ill. a 25°C hőmérsékletet kevésbé tolerálják, mint a tőlük jól elkülöníthető mozgó társaik.

6.14.4 A DTC migráció vizsgálata

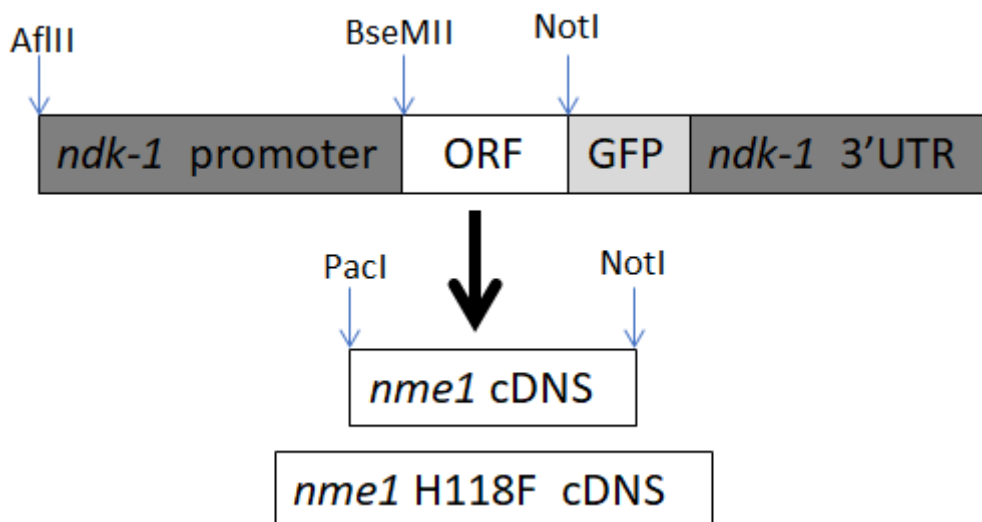
A DTC-k útja könnyedén lekövethető a felnőtt állatok gonádjának morfológiájából. A mikroszkópos vizsgálatokhoz a tárgylemezen lévő 2%-os agarózpádon paralizáltuk az állatokat (1 csepp 1mM levamisol), melyek gonád fenotípusát csak akkor vettük figyelembe, ha az teljes mértékben látható volt (pl. nem takarta ki a bél). Az *ndk-1* (+/-) heterozigóta állatok vizsgálatakor csupán a *ht2* balanszert hordozó, (garat) GFP pozitív állatokat vizsgáltuk, míg az *ndk-1::mCherry*-t túltermelő egyedek esetében a pirosan világító állatokat fotóztuk. A felvételeket Tárnok Krisztián közreműködésével az Élettani és Neurobiológiai Tanszék Zeiss Observer Z1 inverz fluoreszcens mikroszkópjával készítettük, melyeket a Fiji ImageJ programjával dolgoztunk fel, és értékeltük ki.

6.15 Kritikus His¹¹⁸ funkciójának monitorozása

Csoportunkat és a -visszajelzések alapján- tudományos közösséget régóta foglalkoztatta az a kérdés, hogy vajon az *ndk-1*-hez társított funkciókat a kritikus His¹¹⁸-on keresztül látja-e el, illetve, ha az *ndk-1* helyett a humán *NME1*-et fejeztetjük ki az állatban, az képes-e annak helyettesítésére. Ezért célunk volt létrehozni az NDK-1 pontmutánst (C352A), mely a H118N aminosavcseréhez vezet. Ezt a plazmidot Stratagene QuikChange XL II Site-Directed KIT -el a korábban létrehozott *ndk-1::gfp* mosSCI vektorba (pCFJ151) klónozott konstrukció mutagenizálásával hoztuk létre (a példákban a pontmutációt okozó bázisok félkövér nagy betűvel jelölve: H118Nforw: ggacgcaatatctgc**A**acggatccgatgccg, H118Nrev: cggcatcggatccgt**T**gcagatattgcgtcc).

Emellett Patricia Steeg-től megkaptuk a humán *NME1* és annak H118F aminosav cserét okozó pontmutáns verzióját (CA352-353TT) is. Ezeket a cDNS-eket szintén az *ndk-1::gfp*-t hordozó vektorba (pCFJ151) klónoztuk úgy, hogy lényegében lecseréltük az *ndk-1* ORF-jét a humán cDNS-re. Első lépésként AflIII és Not I enzimekkel kiemésztettük az *ndk-1* promóter + ORF régiót, majd ezt a DNS szakaszt BseMII-vel a promóter ORF határon hasítottuk. A humán

cDNS-t olyan primerekkel szaporítottuk fel, melyek a *PacI* (mely esetünkben a *BseMII*-vel azonos túlnyúló véget hagyja hátra) és *NotI* hasítóhelyeket tartalmazták. Az emésztett PCR terméket és az előzőekben kapott a promóter fragmenst együtt ligáltuk vissza az emésztett plazmidba (25. ábra). A kapott konstrukciókkal a mosSCI módszert alkalmazva hoztuk létre a transzgenikus törzseinket.



25. ábra. Az *ndk-1* promóter által meghajtott, humán NME1 és annak kritikus hisztidinjére mutáns változatának klónozási sémája.

6.15.1 A mosSCI módszer

A mosSCI (*mos1*-mediated Single Copy Insertion) technikával lehetőségünk van a kívánt transzgenünk egy kópiás integrálására a *C. elegans* genomjának egy jól definiált lókuszára (Zeiser és mtsai., 2011). A Mos1 a Tc1/mariner típusú DNS transzpozonok családjába tartozik, eredetileg *Drosophila mauritiana*-ból származik, de laboratóriumi körülmények között más organizmusokban is mobilizálható: protozoákban, baktériumokban (Robinson és mtsai., 2004), és gerincesekben is, például zebrafishban (Fadool és mtsai., 1998), ill. *C. elegans*-ban egyaránt. A heterológ transzpozon használatának nagy előnye, hogy beépítésekor és újra mobilizálásakor nem aktiválódnak az adott modellorganizmus endogén transzpozonjai. A módszer további előnye, hogy a transzgen beépülése stabil, az endogénhez közeli szinten kifejeztethető, ráadásul a csíravonalban is (a többkópiás, extrakromoszómális rendszerek esetében a csíravonal védekezik a nagy dózisban megjelenő géntermékekkel szemben). A módszer alapját a kromoszóma adott pontján keletkező, a Mos1 transzpozon excízióját követő kettősszalú DNS törés adja, melyet a sejt DNS javító mechanizmusai állítanak helyre. Ebbe a folyamatba tudunk beleavatkozni: az általunk bejuttatott DNS templátról is

történhet a javítás, mely tartalmazza a töréspont régiójával homológ DNS szakaszokat (1-1,5 kb-os homológ „karok”), és az általunk beépíteni kívánt transzgént. A rendszer jól kidolgozott, számos Mos1 inszerciós törzs áll a rendelkezésünkre, melyekre a specifikus Mos1 excíziós helyeket célzó plazmidot is előállítottak, melyekbe csupán a mi transzgénünket kell beépíteni. A Mos1-et hordozó állatok paralizált, *unc-119* (-) mutánsok, melynek vad típusú menekítő allélját az excíziós helyet célzó plazmid a homológ DNS karok között hordozza, így a marker a transzgénünkkel együtt épül be az inszerciós helyre. Emellett számos fluoreszcens markert is tartalmaz a ko-injekciós mix, melyek az esetlegesen konkatamerré összeálló extrakromoszómális array-eket mutatják. Így azok a mozgó állatok, melyek nem veszítik el ezeket a markereket, jó eséllyel több kópiában tartalmazzák a transzgénünket is. De természetesen az inszerciós régió PCR-el való ellenőrzésére is sor kerül az egykópiás transzgenikus állatok létrehozásának megerősítésére.

Laborunkban a II. kormoszómán (ttTi5605 lókusz) található Mos1-et hordozó EG6699-es törzset, és az azt célzó pCFJ151-es vektort használtuk, melybe az előző pontban bemutatott ORF-eket klónoztuk. Emellett a transzpozázt kifejező plazmidot (pCFJ601) és a következő ko-injekciós, mCherry-t kifejező markereket használtuk, a protokollnak megfelelően (<http://www.wormbuilder.org/test-page/protocol/>): pGH8, pCFJ90, pCFJ104. Mikroinjektálást követően (Mello és Fire, 1995; Rieckher és Tavernarakis, 2017) az F1 nemzedék mozgó állataira szelektáltunk, majd megvizsgáltuk, hogy ezek az állatok elveszítették-e a negatív szelekciós mCherry markereket.

6.15.2 Genetikai keresztezés

Vizsgálatainkat *C. elegans*ban végezzük, gyors életmenetüknek és nagyszámú utódnemzedéküknek köszönhetően rövid idő alatt vizsgálhatjuk beavatkozásaink következményeit, végezhetünk keresztezéseket, így létrehozva kettős vagy többszörös mutánsokat. A *C. elegans*t az is ideális modellszervezetté teszi, hogy a hermafrodita egyedek mellett – melyek stabilan fenntartják a homozigóta alléleket - kis számban (0,2%) hímek is előfordulnak, melyek spermiuma a fertilizáció során előnyt élvez a hermafrodita saját spermiumaival szemben, így a hímek segítségével könnyedén elvégezhetünk keresztezéseket: 10-15 hím (X0) egyedet pároztatunk 5-8 hermafroditával (XX), majd egy napot követően a hermafrodita egyedeket egyesével külön lemezekre tesszük. Utódnemzedéküket megvizsgálva sikeresnek mondható a keresztezés, ha az F1 utódok közel 50%-a hím, mivel a szülői nemzedék hímjeinek ivarsejtjei csak fele arányban tartalmazzák X kromoszómát. Az F1 nemzedék hermafroditáit (általában 5 egyedet) is egyenként külön lemezekre rakjuk tovább, még fiatal,

L3-L4 állapotban, ezzel meggátolva az F1 hímekekkel való további szaporodást. Az F2 nemzedékben az F1 hermafroditák már szegregálják a homozigóta kettős mutánsokat, vagy a transzgént homozigóta formában hordozó egyedeket (Brenner, 1974). A keresztezésből származó F2 nemzedék genotipizálása/szelektálása történhet jól látható fenotípusú mutánsok esetén mikroszkóp segítségével, morfológiailag vad típusú mutánsok vagy transzgének kifejeztetése esetén történhet azok molekuláris hátterének kimutatásával (PCR), vagy marker mutációt tartalmazó keresztezéssel, illetve fluoreszcens jelölés alapján is. A mi esetünkben a mosSCI módszerrel előállított törzseket a TTV1-es törzsbe kereszteztük, így létrehozva az endogén *ndk-1(-)* háttéren az NDK-1(H118N)::GFP, NME-1::GFP és NME-1(H118F)::GFP törzseket, ezzel egyrészt monitorozva a kritikus His funkcióját *C. elegans*-ban, ill. a humán fehérje esetleges menekítő hatását.

6.16 Az NDK-1 interakciós partnereinek azonosítása

Az NDK-1 interakciós partnereinek azonosításához IP-MS módszert alkalmazunk (a korábban leírt DYN-1 kölcsönható partnereinek kereséséhez hasonlóan), kollaborációban Pettkó-Szandtner Aladárral és Medzihradszky Katalinnal (Szeged, SZBK). Ehhez a menekített mosSCI (*ndk-1(ok314);ndk-1(+)* (*pndk-1::NDK-1::GFP*)) törzset használjuk, mivel nem rendelkezünk anti-NDK-1 antitesttel, illetve így a transzgén és az endogén gén közötti kompetíciót is kiküszöböljük. Az együttműködés keretében több alkalommal juttattam el hozzájuk fagyasztott állatokat, melyekből a fehérje izolálástól a tömegspektrometria adatainak elemzéséig mindenben számíthatunk a segítségünkre.

6.17 A klónozáshoz alkalmazott PCR reakciók körülményei

A klónozáshoz nagy pontossággal dolgozó, PfuUltra II Fusion (Finnzymes) polimerázt alkalmaztunk. Minden PCR reakció esetén a gyári ajánlásnak megfelelő PCR reakciókörülményeket és profilokat alkalmaztunk, tekintettel a primereink bekötési hőmérsékletére és az amplifikálandó termék méretére. Az alábbiakban az adott klónozás ligálás előtti emésztési lépéséhez PCR-el felszaporított DNS inszertek primerei láthatóak, bennük vastagon kiemelve a klónozáshoz használt hasítóhelyek szekvenciája.

Az NME1, NME2 és NDK-1 kazetta Sleeping Beauty transzpozonos vektorba ligálásához használt primerek:

THP-1 SB Left (NheI): GTCAGCTAGCGGCTTATCGAAATTAATACGACTC

THP-1 SB Right (ClaI): GACCATCGATACAATGCGATGCAATTTCC

Az *ndk-1::mCherry* fúziós fehérje létrehozásához az mCherry kazetta felszaporításának primerei:

mCherry FW (NotI): ATAAGAATGCGGCCGCATGGTCTCAAAGGGTGAAGAAG

mCherry RV (PacI): CCTTAATTAAGGCTACTTATACAATTCATCCATGCCA

Az *ndk-1::mCherry* kazetta hősokk vektorba való szubklónozásához használt primerek:

Left (NheI): ACTAGCTAGCTAGccaagttggattgtccgaaa

Right (KpnI): CGGGGTACCCCGttaggattggtgccatga

Az NME1 és annak pontmutáns (H118F) változatának a pCFJ151-es mosSCI vektorba klónozásához használt primerek:

NMHumanLeft (PacI): ccttaattaaggGATCCTGGAAGGAACCAT

NMHumanRight (NOTI): ataagaatgcgggccgcTTCATAGATCCAGTTCTGAGCAC

6.18 Statisztika

Kísérleteink eredményeit kétmintás Student-féle t-próbával validáltuk, melyet Microsoft Excel programmal hajtottunk végre. Egyedül a hMDM sejtek fagocitózis vizsgálatát végeztük el egymintás t-próbával. A szignifikancia határát <0.05 értéknél állapítottuk meg.

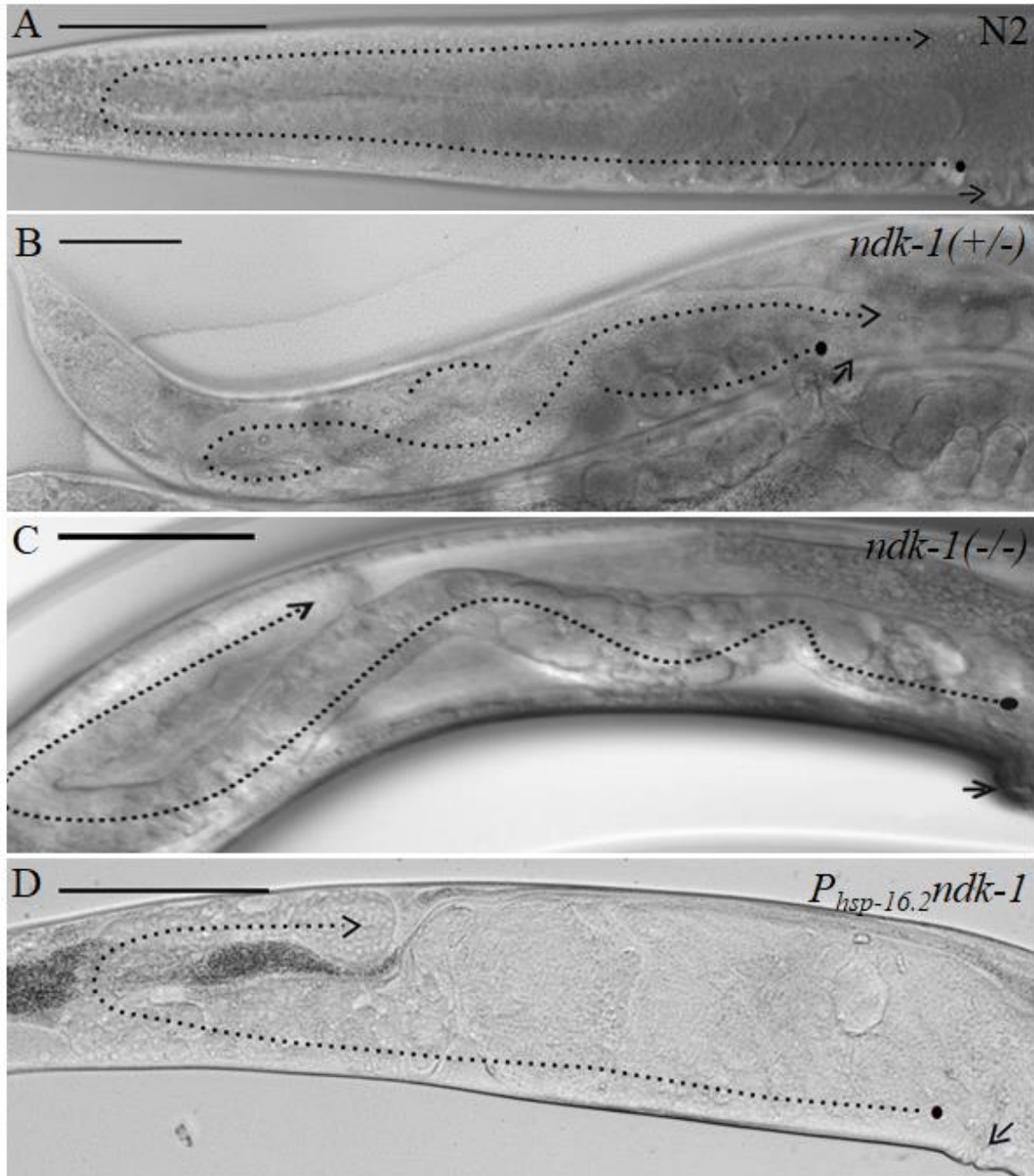
7 Eredmények

7.1 Az NDK-1 DTC migrációra kifejtett dózisfüggő hatása

Hogy igazoljuk az irodalomban fellelhető *Drosophila* NDPK homológ, az AWD dózisfüggő hatásának konzerváltságát, ill., hogy a saját, az irodalmi adatoktól eltérőnek tűnő eredményt (miszerint NDK-1 hiányában a DTC sejtek csökkent migrációt mutatnak) a megfelelő kontextusba helyezzük, megvizsgáltuk az NDK-1 DTC migrációra kifejtett dózisfüggő hatását.

Az *ndk-1* (-) állatokban (funkcionális NDK-1 hiányában) a csökkent DTC migráció következtében J-alakú gonádkarokat figyeltünk meg (26.ábra/C). Ezt kiegészítve vizsgáltuk meg a csökkent dózis hatását *ndk-1* (+/-) heterozigótákban, ill. az NDK-1-et túltermelő transzgenikus törzsben a megemelkedett dózis hatását. A látszólag egészséges *ndk-1* (+/-) heterozigótákban a vad típusú állatokhoz képest fél dózisnyi NDK-1 van jelen, mely az állatok 76%-ában (n=66) vad típusú gonád morfogenezist biztosít, 24%-ukban azonban megfigyelhető volt a DTC-k ektopikus migrációja (n=66). Ebből arra következtethetünk, hogy a fél dózisnyi, vagyis az egyetlen funkcionális *ndk-1* kópiával rendelkező állatok nem képesek elegendő NDK-1-et termelni a vad típusú gonád kialakításához, tehát 24%-os penetranciával megfigyelhető a haploelégtelenség jelensége. Az ennek következtében megfigyelt ektopikus migrációs fenotípusokat 5%-ban „overshoot” (a DTC nem áll meg a vulvával szemben, hanem tovább migrál) ill. 19%-ban „extraturn” (a DTC a normál fejlődéséhez képest további fordulatokat tesz) típusú gonádok tették ki (26.ábra/B).

A megnövekedett NDK-1 szint hatásának vizsgálatához a hősokk promóter által vezérelt P_{hsp-16.2}NDK-1::mCherry törzset hoztuk létre biológiai transzformációval. Fontos kiemelni, hogy több próbálkozás ellenére sem sikerült integrált törzset létrehozni, azonban a legerősebb expressziót mutató törzsben az egyedek 90%-a hordozta extrakromoszómálisan a transzgént, melyek a hősokk hatására mutatták az mCherry expressziót. Ezeknek az állatoknak a 14%-a (n=42) mutatott abnormális DTC migrációt: a nullmutánsokhoz hasonló, csökkent migrációjú J alakú gonádkarokat (26.ábra/D). Az alacsony penetrancia nagy valószínűséggel a transzgén mozaikosságának köszönhető.



26.ábra. DTC vándorlási fenotípusok a különböző NDK-1 szintek függvényében (Farkas és mtsai., 2018 nyomán)

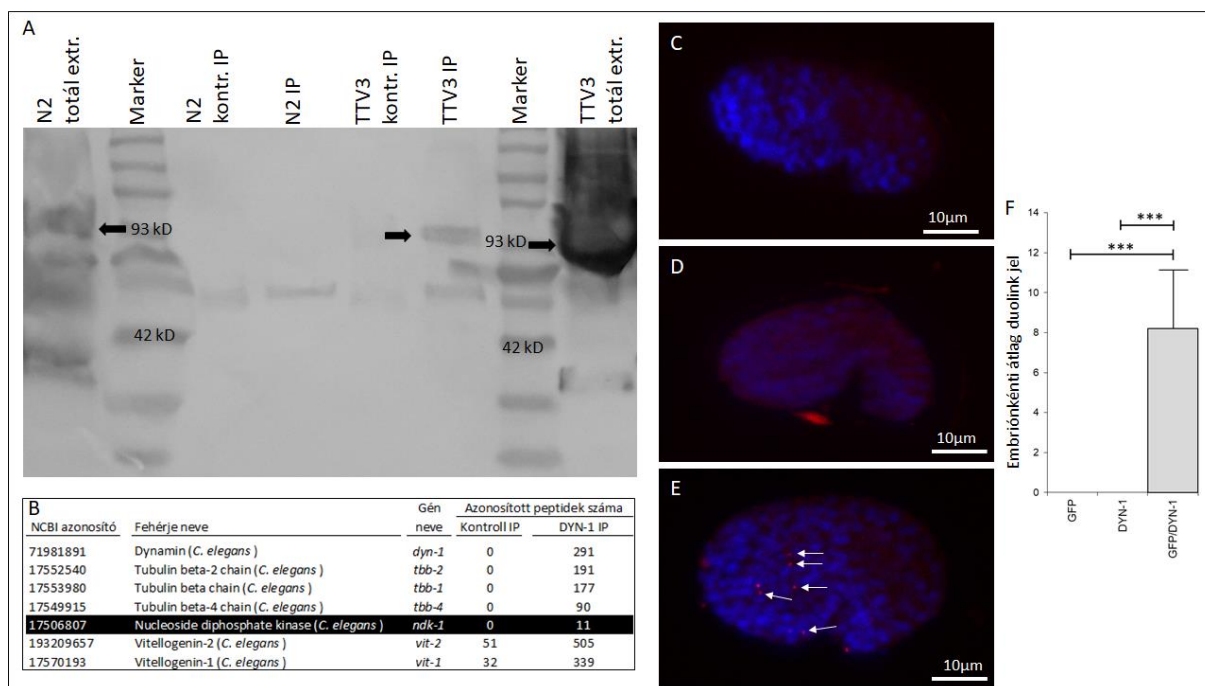
(A) Az NDK-1 megfelelő dózisa szükséges a vad-típusú U-alakú gonádkarok kialakításához. Ezen dózis bárminemű változása különböző DTC migrációs fenotípusokhoz vezet: (B): az *ndk-1(+/-)* heterozigóták 24%-os penetranciával ektopikus migrációt mutatnak (az ábrán az „extratum” fenotípus látható). (C) Az *ndk-1(-/-)* homozigóták túlnyomó többsége redukált migrációt mutat, mely J alakú gonádkarokban nyilvánul meg. (D) Az NDK-1 túltermelésekor az előzőhöz hasonlóan csökkent migrációt figyeltünk meg, azonban a transzgén mozaikossága miatt csupán 14%-os penetranciával. Minden ábrán 100 μ m a skála, nyíllal jelöltük a vulvát, míg szaggatott vonallal emeltük ki a gonádkarok alakját, vagyis a DTC útját.

7.2 Az NDK-1 és NME1 szükséges az apoptotikus bekebelezéshez, és a fagocitózishoz, mely hatást a DYN-1 / dynamin-on keresztül fejtik ki

Mielőtt a módszerekben bemutatott kísérletek eredményeit bemutatnám, röviden kitérnék az előzményekben említett, általam elvégzett korábbi, idevágó eredményeinkre, azaz, hogyan kapcsoltuk az NDK-1-et az apoptotikus bekebelezés folyamatához és a DYN-1-hez. A munka jelentős részét Fancsalszky Luca végezte el, azonban munkahelyváltása miatt a kísérletek egy részének elvégzése a csoportra maradt. Egyrészt az apoptotikus testek bekebelezésére ható folyamatok episztázis elemzésének befejezéséhez megvizsgáltuk a *ced-10(n1993)* mutánsokban a bekebelezetlen apoptotikus testek számát, illetve ugyanezt megnéztük a *ced-10(n1993);ndk-1(ok314)* és az *abi-1(ok640);ndk-1(ok314)* kettősmutánsokban is. A kettősmutánsok esetében az egyedi embriókat fotózásukat követően visszavettük NGM lemezekre (mivel nem lettek visszakeresztezve a *ht2* balanszeres rendszerbe), és csak abban az esetben vettük figyelembe a bennük mért apoptotikus testek számát, ha azok steril felnőttekké nőttek (azaz az *ndk-1* deléciós alléljára homozigóták voltak). A törzsekben az *abi-1* és *ced-10* mutáns allélek homozigóta jelenlétét még a keresztezést követően a PCR termék restrikciós endonukleázokkal való emésztési mintázatával, azaz PCR-RFLP-vel (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism) bizonyítottuk (eltér a vad alléltól). Az episztázis elemzés eredményeként elmondhatjuk, hogy a DTC migráció esetében mérteknek megfelelően az *ndk-1* a *ced-10*-től downstream hat (*ced-10*-nek megfelelő mennyiségű apoptotikus test a kettősmutánsokban), míg az *abi-1*-el párhuzamosan fejt ki hatását (az egyszeres mutánsokhoz képest jelentősen több apoptotikus test a kettősmutánsokban) (Fancsalszky és mtsai., 2014/ 5. ábra F-M). Továbbá bizonyítottuk, hogy az embrión túl a gonádban is megnövekszik az apoptotikus testek száma az *ndk-1* hiányában. Mivel az *ndk-1(ok314)* mutánsok gonádjában a csírasejtek nem érik meg az intenzív apoptózis fázisát, ezért RNSi-val csendesítettük az *ndk-1*-et: sikerült kimutatni a megnövekedett számú apoptotikus testet a gonádban is. Ha a gonád toksejtjeiben (melyek az apoptotizáló csírasejtek bekebelező sejtjei) specifikusan fejeztettük ki a CED-1::GFP fúziós fehérjét, akkor jól láthatóan az elhalt sejtek körül kaptuk az expressziót, mely szintén több sejtet jelölt *ndk-1(RNSi)* háttéren a vad kontrollhoz képest (23. ábra/C, Fancsalszky és mtsai., 2014/ 5. ábra A-E). Végül a *ced-1* útvonal vizsgálatakor mutattunk ki genetikai interakciót az *ndk-1* és a *dyn-1* között: az *ndk-1(ok341);dyn-1(ky51)* kettősmutánsok nem életképesek (100% embrionális letalitás). Emellett az *ndk-1* (-) embriók közel 16%-a a *dyn-1* (-) mutánsokhoz hasonlóan késői embrionális korban elpusztul, mely embriókban kimutathatóak az eltakarítatlan apoptotikus testek (23. ábra/A, Fancsalszky és mtsai., 2014/ 6. ábra).

7.3 Az NDK-1 és DYN-1 fehérjék fizikai interakciójának kimutatása *C. elegans*-ban

Hogy az imént bemutatott kapcsolatot az NDK-1 és DYN-1 között jobban megismerjük -és ezáltal az apoptotikus bekebelezés és az apoptotikus test eliminálásának folyamatát jobban megértsük -, többféle módszerrel mutattuk ki a közöttük lévő fizikai interakciót. Egyrészt sikerült ko-immunoprecipitációval kimutatni fizikai kölcsönhatásukat: az NDK-1::GFP fúziós fehérje (és annak kapcsolódó partnereinek) anti-GFP antitesttel való precipitációját követően poliklonális anti-DYN-1 antitesttel sikerült detektálni a DYN-1 jelenlétét a komplexben (27.ábra/A). Ezt az eredményt támogatja, hogy amerikai partnerünk, Zheng Zhou (Baylor College of Medicine, Houston, USA) csoportja végrehajtott egy IP-tömegspektrometriás kísérletet, mely során a DYN-1 interakciós partnereit keresték. Vad típusú, kevert tenyészetű állatokból kiindulva az előbbi poliklonális anti-DYN-1 antitesttel precipitáltak, majd tömegspektrometriával azonosították a DYN-1 interakciós partnereit. A találati listájukat a ProteomeXchange Consortium-ban tették közzé, melyről az azonosított fehérjék egy része a 27. ábrán látható. Ezek közül mikrotubulus komponenseket (tubulin 1, 2 és 4) is találunk, mely megerősíti a lista helyességét, mivel a DYN-1-et elsőként mikrotubulus-interakciós fehérjeként azonosították (Shpetner és Vallee, 1989). Így az NDK-1 jelenléte ezen a listán (és hiánya a kontroll listán) alátámasztja, hogy kölcsönható partnere a DYN-1-nek, különösen, ha az általunk elvégzett irányított ko-immunoprecipitációs kísérlet eredményével együtt kezeljük.



27.ábra. A *C. elegans* NDPK, az NDK-1 egy komplexben fejt ki hatását a DYN-1-el (Farkas és mtsai., 2019 nyomán)

(A) Az NDK-1 és DYN-1 ko-immunoprecipitációját az NDK-1::GFP-re specifikus anti-GFP (3E6) antitesttel végeztük, kontrollnak anti-tubulin egér IgG, míg a detektáláshoz anti-DYN-1

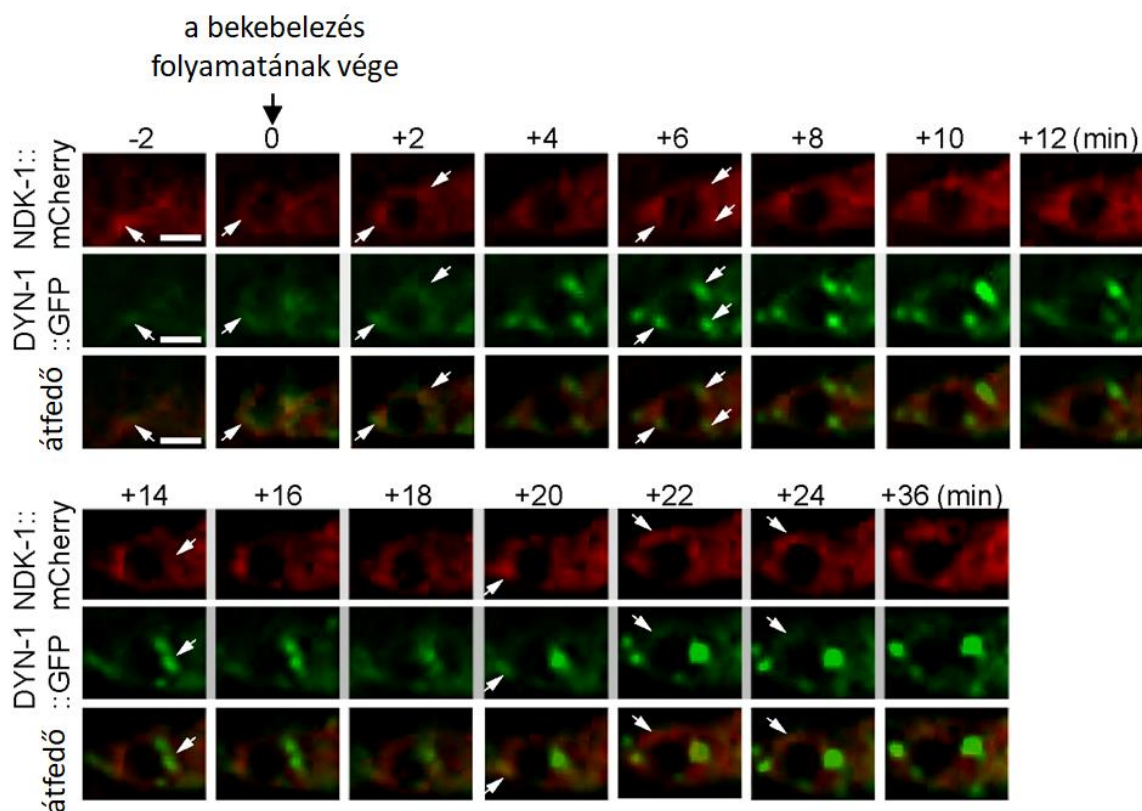
antitestet használtunk. A nyilak a DYN-1-et jelölik, mely *C. elegans*-ban 93kD méretű. Az oszlopokat a következő sorrendben töltöttük fel: N2 (vad-típus) totál extrakt, molekulatömeg marker, N2 extrakt a nem specifikus egér IgG-vel precipitálva, N2 extrakt az anti-GFP antitesttel precipitálva, TTV3 (NDK-1::GFP transzgenikus törzs) extrakt a nem specifikus egér IgG-vel precipitálva, TTV3 extrakt az anti-GFP antitesttel precipitálva, molekulatömeg marker, TTV3 totál extrakt. **(B)** Zheng Zhou által leírt, a DYN-1 interakciós partnereinek részleges találati listája: feketével kiemelve az NDK-1. **(C-F)** A DPLA assay alátámasztja az NDK-1 és DYN-1 interakcióját *C. elegans* comma stádiumú embriókban. Fagyasztva tört és fixált NDK-1::GFP-re transzgenikus embriókat jelöltünk anti-GFP és anti-DYN-1 antitestekkel, majd elvégeztük a Duolink jelölés lépéseit. Mikroszkópos vizsgálatkor csak a comma állapotú embriókat (laterális nézet, anterior pólus bal oldalt) vizsgáltuk, mely során a kék festés (DAPI) jelöli a sejtmagokat, míg a piros pontok (nyilakkal jelölve) a Duolink jelek. A negatív kontrollok esetében (C-D) (amikor csak az egyik antitestet adtuk a mintákhoz) nem kaptunk jelet, míg, ha mindkét antitesttel inkubáltunk, kaptunk Duolink jelet (E). **(F)** Embriónkénti átlagos Duolink jel mennyisége. A szórás az átlag standard hibáját jelöli, míg a *** a Student t-teszt alapján a kontrolltól való szignifikáns eltérést jelöli (n=10).

A fenti kísérletek bizonyítják, hogy a két fehérje képes kölcsönhatásba lépni egymással. A továbbiakban *in vivo* szeretnénk volna igazolni a két fehérje kapcsolatát. Mivel a *C. elegans* egyedfejlődése alatt a programozottan elpusztuló szomatikus sejtek nagy része az embriogenenezis során pusztul el (a 131-ből 109) (Sulston és mtsai., 1983), ezért fixált comma stádiumú embriókban vizsgáltuk a két fehérje kapcsolatát a DPLA assay segítségével (27. ábra). Ebben a stádiumban a vad típusú állatokban közel 11 apoptotikus test figyelhető meg DIC (differential interference contrast) optika felhasználásával (Fancsalszky és mtsai., 2014). DPLA alkalmazásakor csak abban az esetben kapunk pozitív jelet, ha a kívánt fehérjéink fizikailag közel vannak egymáshoz (30 nm); mi embrióként átlagosan nagyjából 8 pozitív jelet kaptunk (27. ábra/E-F), mely korrelál az ebben a stádiumban megfigyelt átlagosan 11 apoptotikus test mennyiségével, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy az általunk vizsgált apoptotikus bekebelezést az elhaló sejtek körüli szomszédos sejtek végzik, melyekben a detektálás időpontjában még nem feltétlenül aktiválódott minden apoptotikus test környezetében a bekebelezés mechanizmusa.

Adataink összeségében bizonyítják, hogy az NDK-1 és a DYN-1 fehérje egy komplexben működnek.

7.4 Az NDK-1 és a DYN-1 egyaránt jelen van a korai fagoszómák felszínén (kollaboráció Zheng Zhou csoportjával)

Hogy jobban megismerjük a két fehérje viszonyát (és az NDK-1 szerepét) az apoptotikus bekebelezés folyamata során, létrehoztuk a mindkét fehérjére transzgenikus törzset, melyben *ced-1* promóter vezérelt DYN-1::GFP-t és NDK-1::mCherry-t fejeztettünk ki, ezzel biztosítva, hogy csak az apoptotikus bekebelezést végző sejtekben figyelhessük meg a két fehérje dinamikáját. Az élő transzgenikus embriókban valós idejű mikroszkópiával figyeltük meg a két fehérje szerepét az apoptotikus bekebelezés és az azt követő fagoszómaérés folyamataiban (Z. Li és mtsai., 2013). A DYN-1-ről partnereink már korábban leírták, hogy felhalmozódik a növekvő pszeudopodokban ill. az érő fagoszómák felszínén (Yu és mtsai., 2006). Ezzel összecsengően az NDK-1::mCherry felhalmozódását figyeltük meg a formálódó, majd érő fagoszóma felszínén is (28. ábra). Az expresszió időintervalluma átfed a DYN-1-ével, ill. többször megfigyelhető volt a két fehérje ko-lokalizációja (28. ábra).

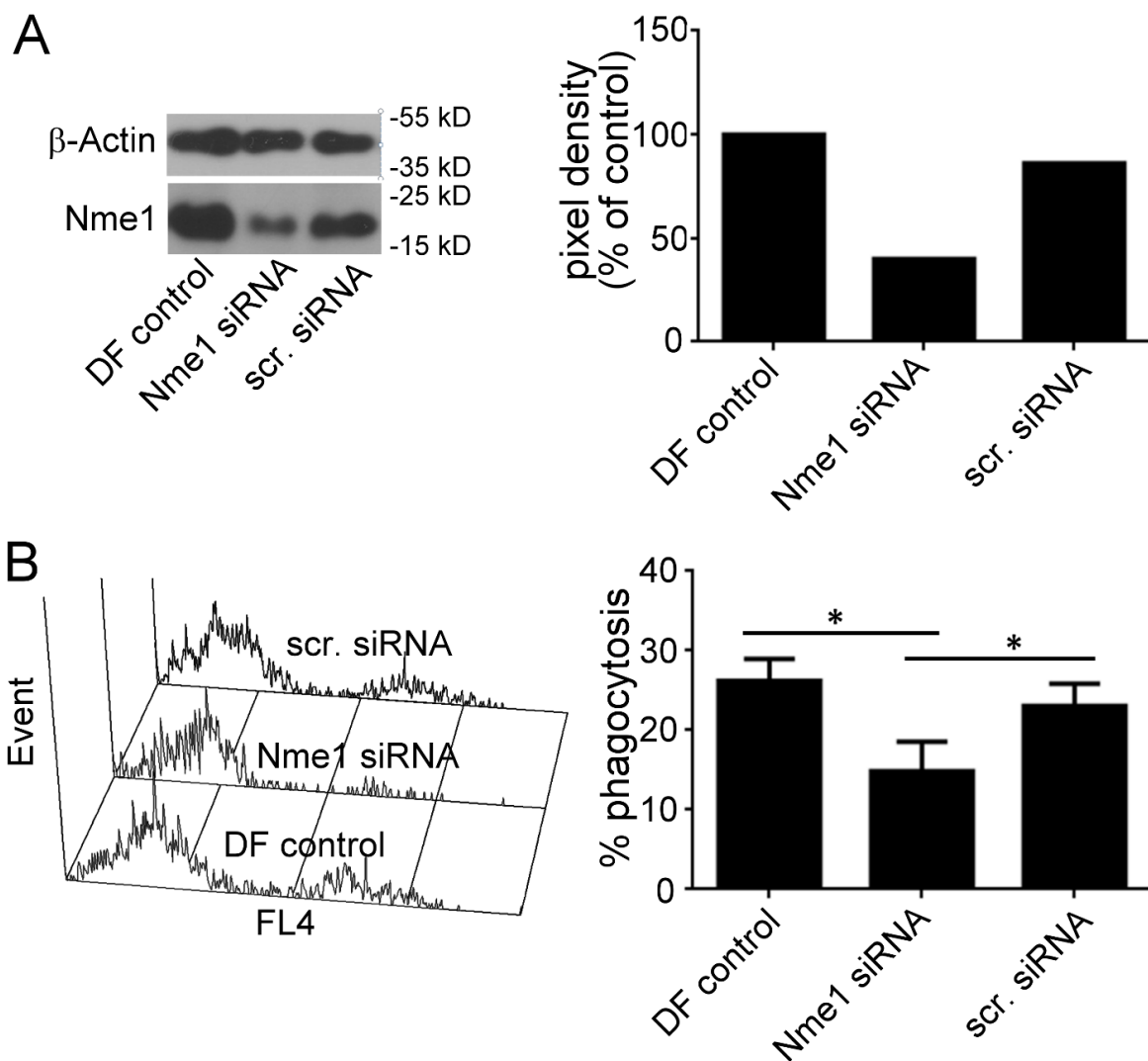


28. ábra. Az NDK-1 és a DYN-1 egyaránt kifejeződik a képződő pszeudopodok és az érő fagoszómák felszínén (Farkas és mtsai., 2019 nyomán)

A C3-as apoptotikus testet (Yu és mtsai., 2006) bekebelező sejtben valós idejű mikroszkópiával megfigyelhető a DYN-1::GFP és NDK-1::mCherry ko-expressziója (n=10). A „0” perc jelöli a fagoszóma kialakulásának pillanatát. A két fehérje ko-lokalizációját nyilak jelölik, a skála 2.5μm.

7.5 Egér csontvelői makrofágokban (bone marrow derived macrophages: BMDM) az NM23-M1/NME1-nek szerepe van az apoptotikus sejtek bekebelezésében (kollaboráció Szondy Zsuzsa csoportjával, Debreceni Egyetem)

Az apoptózis, ill. az apoptotikus bekebelezés háttérében húzódó genetikai útvonalak nagymértékben konzerváltak a fonálféreg és az emlősök között (Conradt és mtsai., 2016). Ezért megvizsgáltuk, hogy a *C. elegans*-ban az NDPK-k apoptotikus bekebelezésben feltárt szerepe is evolúciósan konzervált-e, ezért az egér NM23-M1-nek a BMDM-ek bekebelező funkciójára gyakorolt hatását vizsgáltuk Szondy Zsuzsával és kollégájával, Budai Zsófiával együttműködésben. *In vitro* fagocitózis assay keretében az NM23-M1 fagocitózisban betöltött szerepét az apoptotikus bekebelezés folyamatán keresztül vizsgáltuk: egér csontvelői makrofágokban megfelelő kontroll mellett csendesítettük az NM23-M1-et, majd ezekkel a makrofágokkal csecsemőmirigyből izolált, jelölt timocitákat adtunk, majd a kezelt BMBM-ekkel 1 órán át történő inkubálás után meghatároztuk a bekebelezett timociták arányát. A makrofágok az NM23-M1 specifikus RNSi kezelést követően 40%-al kevesebb apoptotikus timocitát fagocitáltak, mint a kontroll RNS-el kezelt makrofágok (29.ábra /B). A kezelt sejtekben western blottal mértük az NM23-M1 csendesítésének hatékonyságát, mely alapján 55%-os fehérjeszint csökkenést mértünk (29.ábra /A). Tehát az NM23-M1 csendesítése sikeresnek mondható, mely korrelál a megfigyelt fagocitikus kapacitás csökkenésével.



29. ábra. Az NM23-M1 csendesítése a BMDM-okban szignifikánsan csökkentette azok apoptotikus sejteket való bekebelezési képességét (Farkas és mtsai., 2019)

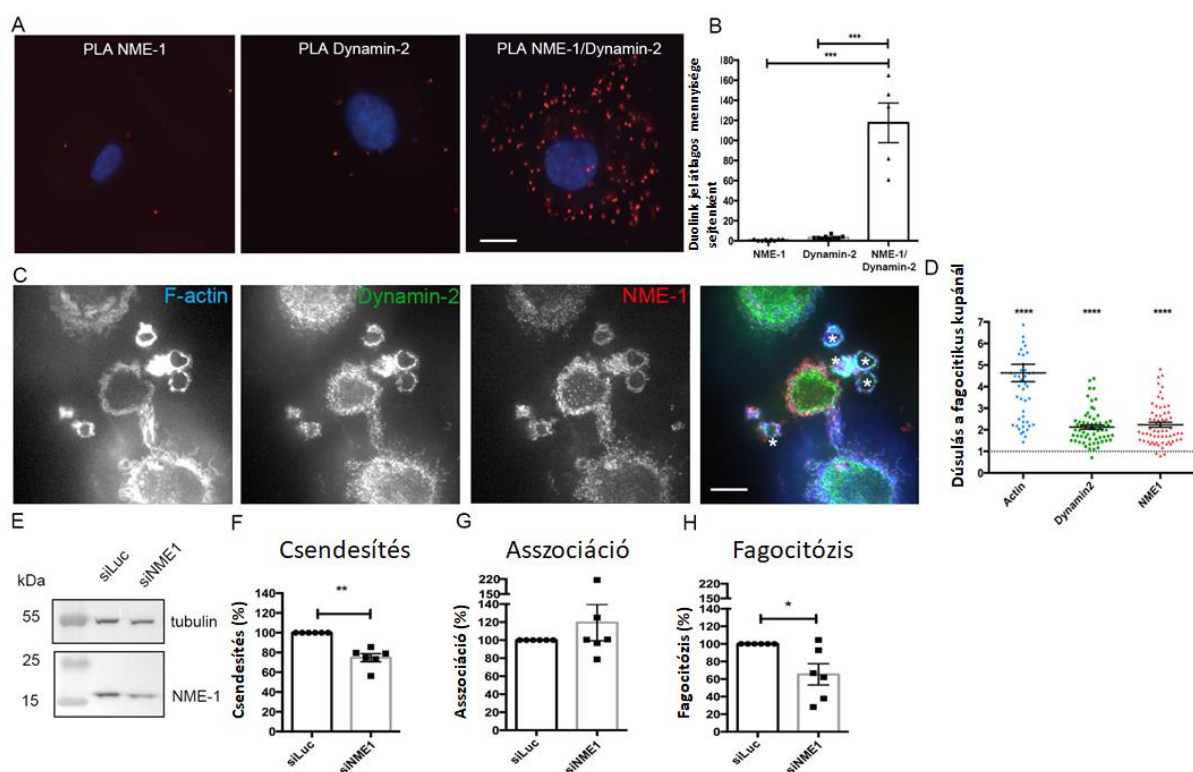
A makrofágokat NM23-M1 specifikus, illetve „nontargeting” kontroll siRNS-el kezeltük (Dharmafect transzfekciós reagenssel), és a reagens kontrollhoz hasonlítottuk azok hatását. A transzfekciót követő 48 órával később a sejtek egy részében western blottal mértük az NM23-M1 szintjét (A), a másik részével a fagocitózis vizsgálatot végeztük el, mely során apoptotikus timocitákkal inkubáltuk a makrofágokat (B). Az ábrán szereplő értékek az adott mérés átlagából adódnak (n=5), * jelöli a kontrolltól való szignifikáns eltérést a Student t-teszt alapján.

7.6 Az NME1 funkciója humán makrofágokban nélkülözhetetlen a fagoszóma kialakulásához (együttműködés Mathieu Boissan és Florence Niedergang csoportjaival, INSERM, Paris, Franciaország)

Az NDPK-k és a dynaminok konzervált kapcsolatának további bizonyítására vérből izolált humán monocitákból *in vitro* differenciáltatott makrofágokban vizsgáltuk a két fehérje (NME1 és dynamin-2) kapcsolatát. A *C. elegans* embriókhoz hasonlóan itt is a DPLA assay-t alkalmaztuk, mellyel emberi makrofágokban is bizonyítottuk a két fehérje *in vivo* kapcsolatát (30. ábra /A, B).

Hogy megértsük az NME1 humán makrofágokban betöltött szerepét, megfigyeltük az NME1 és a dynamin-2 toborzását a nem opszonizált zymosan gyöngyök által kiváltott fagocitózis folyamata során. A két endogén fehérjét specifikus antitestekkel jelöltük, melyek együttes toborzását figyeltük meg a fagocitikus kupáknál (melyeket F-aktin jelenléte jelöl) (30. ábra/C). A mérések alapján kiszámoltuk a bekebelező sejtekben a zymosan részecskék körüli toborzási indexeket: az F-aktin jelenléte a fagocitikus kupáknál a sejtkereg fagocitózisban nem érintett régióhoz viszonyítva 4-szeres emelkedést mutatott, míg az NME1 és dynamin-2 esetében ez az érték több, mint 2-nek adódott (30. ábra/D), egyértelműen mutatva jelenlétüket a bekebelező sejt fagocitikus régióiban.

Hogy bizonyítsuk az NME1 fagoszóma kialakításához társított szerepét, RNSi-vel csendesítettük azt (30. ábra/ E-H). Ugyan a makrofágokban sosem teljes mértékű a csendesítés (Marion és mtsai., 2012), de specifikus szekvenciával (Boissan és mtsai., 2014) sikerült szignifikánsan csökkenteni az NME1 mennyiségét a kontrollhoz képest (30. ábra/E, F). Ezt követően a 6 donorból differenciáltatott, RNSi-vel kezelt és a kontroll makrofágokkal egyaránt elvégeztük az IgG-opsonizált részecskék fagocitózisának vizsgálatát. A fagocitózis assay során a részecskék sejthez való kötődését (2 perc, 30. ábra/G) ill. a bekebelezés hatékonyságát mértük (60 perc, 30. ábra/H). Adataink azt mutatják, hogy az NME1 csendesítésének következtében szignifikánsan csökkent a fagocitózis mértéke, míg a részecskék sejthez való kötődésében (asszociáció) nem történt változás a kontrollhoz képest. Eredményeink alapján elmondható, hogy az NME1 egy fontos faktor a humán makrofágok receptor-mediált fagocitózisában.



30. ábra. Az emberi NME1 szerepe a fagoszóma kialakulásában (Farkas és mtsai., 2019 nyomán)

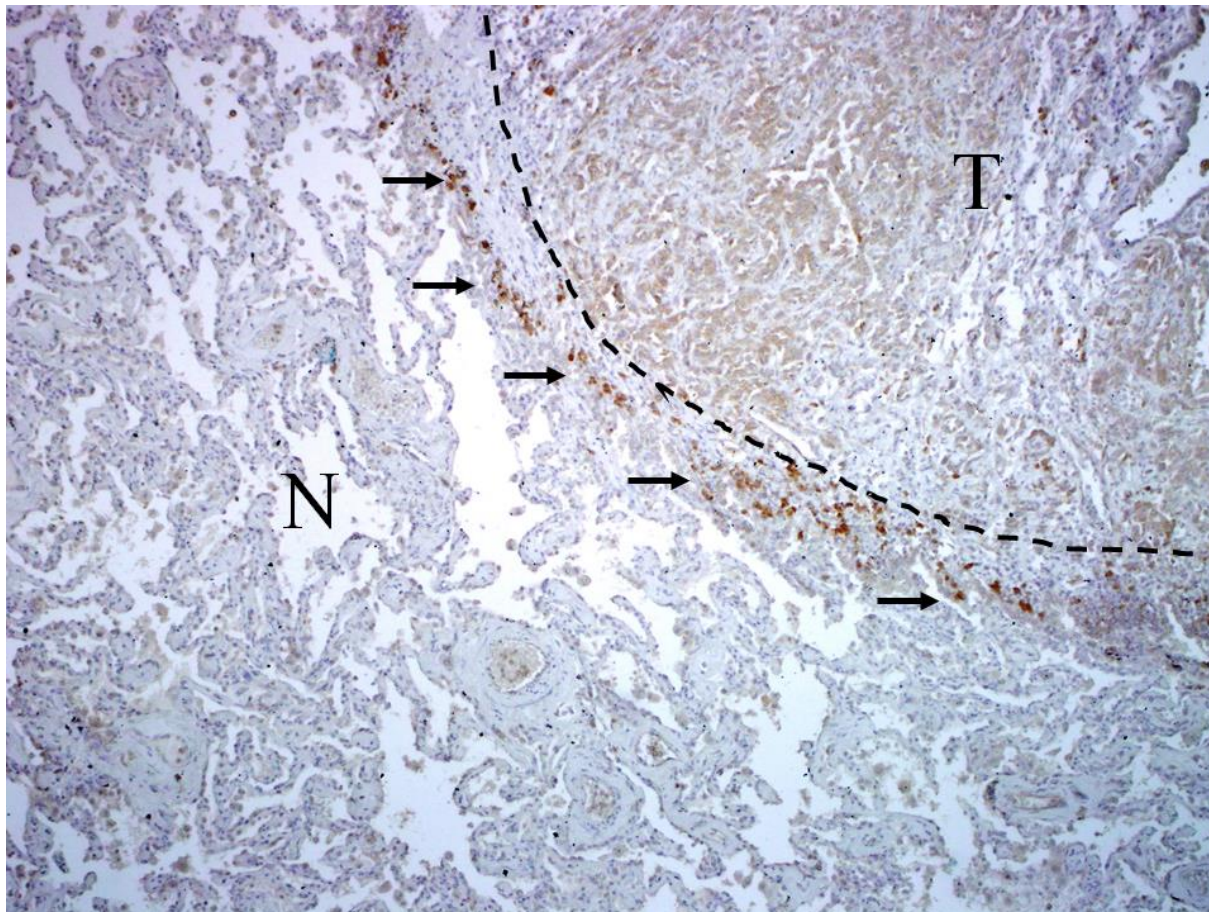
A kísérletekben használt makrofágok emberi vérből izolált monocitákból lettek *in vitro* differenciáltatva. **A, B:** A DPLA kivitelezése anti-NME1 és anti-dynamin-2 antitestekkel történt, a pozitív duolink jelek (piros pontok) kvantifikálását és analizálását ANOVA-val végeztük. **C:** Egyazon konfokális sík látható az ábrákon, *-al vannak jelölve a fagocitikus kupák. A zymosan részecskéket 10 percig inkubáltuk makrofágokkal, majd a fagocitózist követően a mintákat fixáltuk, permeabilizáltuk, és az alábbi jelölőket adtuk: Alexa 635 phalloidin, anti-NME1, Cy3-al jelölt anti-egér IgG, anti-dynamin-2, Alexa 488-al jelölt anti-nyúl IgG. **D:** A fagocitikus kupa körüli toborzási indexek.

E-H: Az NME1 hatása a fagocitózisa. A makrofágok egy része az siRNS (siNME1, ill. a kontroll siLuciferáz -siLuc) kezelést követő 72 órával western blot (E, F), míg másik része a fagocitózis vizsgálathoz lett felhasználva (G, H). Az asszociáció mértékét és a fagocitózis hatékonyságát a módszerekben leírtak szerint állapítottuk meg, melyeket %-os arányban a kontrollhoz képest ábrázoltunk. A szórás az átlag standard hibáját jelöli, a skála 5 μ m, eredményeinket Student t-tesztel analizáltuk, *P , 0.05, **P , 0.01, ***P , 0.001, ****P , 0.0001.

7.7 NME1, NME2 és NDK-1 túltermelése humán makrofág sejtvonalakban

Az NDPK-k apoptotikus bekebelezésben betöltött konzervált szerepén túl kíváncsiak voltunk, hogy túltermelésük esetlegesen növeli-e azok fagocitáló kapacitását. Ez az elgondolásunk egy másik kísérlet során merült fel, melyben Döme Balázs (Országos Korányi Pulmonológiai Intézet) csoportjával együttműködve az NDPK-k mellhártya rosszindulatú daganatában (pleurális mezotelióma) betöltött szerepét vizsgáltuk: egy NME1-specifikus antitesttel (Mathieu Boissan

bocsátotta rendelkezésünkre) festett immunhisztokémiai mintában a daganat körüli makrofágok erősen jelölődtek (31. ábra). Ez a megfigyelés is azt sugallja, hogy az NDPK-k szerepe fontos lehet a makrofágok működésében.



31. ábra Az NME1 expressziója primer malignus pleurális mezoteliómában (MPM)

A tumoros szövetet (T) szaggatott vonallal különítettük el az egészséges, nem tumoros (N) szövetétől. Az NME1 immunhisztokémiai festésekor (barna) a tumoros szövet határán, az abba benyomuló makrofágok (nyilakkal jelölve) festődtek a legerősebben.

Célul tűztük ki a makrofágokban az NDPK-k (NME1, NME2 és NDK-1) túltermelését. Ez azonban rögzesebb útnak bizonyult a vártnál. Eredetileg THP-1 makrofágokat szerettünk volna a már meglévő CMV (citomegalovírus) promóterrel hajtott konstrukcióinkkal stabilan transzfektálni, azonban ez az AMAXA KIT-hez adott kontroll GFP vektort kivételével nem sikerült. Így a „kevésbé látványos” G418 szelekciót kiváltó, az Orbán Tamás laborjában rutinszerűen alkalmazott sleeping beauty transzpozonos génbeviteli eljárásra váltottunk, amiben a sikeres transzfekciót mCherry marker jelezte. A THP-1-et továbbra sem sikerült az AMAXA rendszerrel sikeresen transzfektálni (sőt, sokszor nagyfokú mortalitást tapasztaltunk),

míg a kontroll sejtvonálnak használt HEK-293 esetében mindegyik konstrukcióval kaptunk stabil, mCherry pozitív sejtvonalat. Így a továbbiakban megpróbáltuk egy másik makrofág vonalba, az U937-be juttatni a konstrukcióinkat. Mivel mind maga a sejtvonat, mind a transzfekciójukhoz szükséges elektroporációs eljárás az ELTE Immunológiai Tanszékén rendelkezésre állt, így az ő forrásaikat felhasználva próbálkoztunk tovább. Elsőre 10%-os transzfekciós hatékonyságot értünk el, mely sajnos kevésnek bizonyult stabil sejtpopuláció előállításához. Pár próbálkozás után egy ígéretes, transzfekciós reagens használatára váltottunk, mellyel a THP-1-et továbbra sem, az U937 sejteket kis hatékonysággal sikerült transzfektálni, majd elpusztultak a vonalak, míg a HEK-293 az mCherry kontrollvektorral ismét könnyedén adott stabil vonalat, az NME1-et túltermelő vektorral pedig egy kezdeti nagy arányú mortalitást követően szintén sikerült stabil vonalat előállítani.

Összességében elmondható, hogy ugyan a makrofág sejtvonalak transzfekciója nehézkes, sokszor alacsony hatékonyságú, de sikeres transzfekciót követően sosem sikerült a vonalakat fenntartani. Ha figyelembe vesszük, hogy a bármely NDPK-val transzfektált HEK-293 vonal is eleinte nehézkesen nőtt fel - szemben a kontrollvektorral transzfektált vonalakkal -, és a korábban megfigyelt, az NDPK-k különböző dózisaival kiváltott hatással is kalkulálunk, akkor nagy az esélye, hogy a makrofágok esetében nem csak az alacsony transzfekciós hatékonyságból következő kis számú sejttömegből való felnevelés vezetett a sejtek pusztulásához, hanem a megnövekedett NDPK dózis is lehet a makrofágok pusztulásának hátterében, melyek az említett immunhisztokémiai festés alapján már eleve nagyobb dózisu NDPK-val rendelkeznek.

7.8 Az NDK-1 kölcsönható (fehérje)partnereinek azonosítása

Az SZBK-s együttműködésünk keretében eddig 3 IP-MS reakciót futtattunk le, mely alapján a GDH-1 (glutamát dehidrogenáz) adódott az egyik legígéretesebb találatnak. A *gdh-1* gén minden élő szervezetben megtalálható, a glutamát α -ketoglutaráttá és ammóniává alakítását katalizálja, mely folyamat során a $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ -vá való redukciója is bekövetkezik. Az így keletkezett α -ketoglutarátot emlősökben a Krebs ciklus dolgozza fel, ATP-t szintetizálva. Emellett számos jelentős folyamatban van szerepe a glutamát dehidrogenáznak, mint például az ammónia anyagcsere, lipid bioszintézis stb. (Plaitakis és mtsai., 2017). Fontos kiemelni, hogy a glutamát dehidrogenáz negatív szabályozója a GTP, így jó eséllyel valóban köthető az NDPK-khoz.

A továbbiakban még több IP-MS ismételtes várható, mellyel tovább szűkíthetjük az NDK-1 potenciális interakciós partnerek körét.

8 Diszkusszió

Az NME1 -mint az első leírt metasztázis inhibitor- a tumorsejtek migrációs és inváziós tulajdonságainak gátlásáról ismert: számos invazív tumorsejtvonalban (pl. mell, vastagbél, hepatocelluláris karcinóma, ill. melanóma) alacsony NME1 szintet mértek. Több kísérletben is bizonyították, hogyha ezen sejtekben kifejeztették a transzgenikus NME1-et, az csökkentette azok migrációs potenciálját. Ellenkező esetben, vagyis a nem invazív vastagbél ill. hepatocelluláris sejtek (melyekben magasabb, vagyis normális szintű az NME1) az NME1 csendesítésének hatására az EMT jellemzőit mutatták: invazívvá váltak, megszűntek az adhézis sejt kapcsolataik, és a tumorfejlődésnek kedvező jelátviteli útvonalak aktiválódtak bennük (Boissan és mtsai., 2010). Ezekkel a megfigyelésekkel nem egyezett csoportunk korábbi eredménye, miszerint az NME1 *C. elegans* ortológja, az NDK-1 hiányában egy speciális migráló sejt, a DTC által megtett út csökken a vad típushoz képest: „U” alakú gonádkarok helyett csupán „J” alakú gonádkarokat alakít ki az *ndk-1* $-/-$ nullmutáns (Fancsalszky és mtsai., 2014). Vagyis míg humán sejtekben az NME1 csendesítése fokozott migrációs potenciálhoz vezetett, addig a nematóda homológ NDK-1 hiánya csökkent sejt migrációt eredményezett. Viszont az NDK-1 túltermelése humán invazív emlőkarcinóma sejtvonalban az NME1 túltermelésének megfelelő hatást váltja ki, azaz a sejtek migrációs potenciálját csökkenti (Fancsalszky és mtsai., 2014). Ezért szerettük volna megérteni, hogy mi zajlik le a nematódában, aminek köszönhető az eredetileg megfigyelt ellentmondás.

Ezért megvizsgáltuk az NDK-1 fél dózisének a DTC migrációra gyakorolt hatását, ill. egy NDK-1-et túltermelő törzs létrehozásával az emelkedett dózis következményeit is megfigyeltük. Az *ndk-1* $+/-$ heterozigóták gonádmorfológiájának vizsgálatakor az esetek 24%-ában ektopikus migrációt figyeltünk meg, míg az emelkedett NDK-1 dózis esetében 14%-ban inkomplett migrációt, azaz „J” alakú gonádkarokat kaptunk: a DTC migráció a dorzális fázisban reked meg, ahol az NDK-1 eredetileg hat. Adataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az NDK-1 különböző dózisa többféle DTC migrációs fenotípust váltanak ki: az NDK-1 hiánya inkomplett DTC migrációt eredményez, a vad típusúhoz képesti fél dózis 24%-os penetranciával ektopikus migrációhoz vezet, a vad típusú dózis alakítja ki a normál, „U” alakú gonádkart, míg emelkedett dózis esetén 14%-os penetranciával inkomplett migrációt figyeltünk meg. Az irodalom alapos átnézését követően találtunk hasonló jelenséget *Drosophila*-ban, így az alábbi táblázatot állítottuk össze (1. táblázat).

Modell	NDPK hiánya	Heterozigóta, vagy alacsony NDPK dózis	NDPK Túltermelés
<i>D. melanogaster</i> (bordersejt migráció)	nincs migráció	alacsony endogén dózis: migráció	nincs migráció
<i>D. melanogaster</i> (tracheasejt migráció)	struktúra komplett zavara	ektopikus migráció	?
<i>C. elegans</i> (DTC migráció)	inkomplett migráció	ektopikus migráció	inkomplett migráció
MDA-MB231T invazív emlőkarcinóma sejtvonal	?	alacsony endogén dózis: migráció	alacsony migrációs potenciál NME1, NME2 és NDK-1 túltermeléskor is

1. táblázat. Az NDPK-k dóziszfüggő hatása a sejtmigrációban

Az irodalomban a legtöbb kapcsolódó adat humán sejtvonalakból és *Drosophila*-ból származik. Csoportunk *C. elegans*-on vizsgálta először a különböző NDPK dózisok teljes sorozatának hatását (NDK-1 hiánya, fél dózis, normál dózis, emelkedett dózis) a migráló DTC sejtekre. Adataink és az irodalmi eredmények alapján azt feltételezzük, hogy az NDPK-k különböző szintjei eltérő sejtmigrációs fenotípust okoznak: (1) Az NDPK-k hiánya minden modellben a migráció gátlását, ezáltal súlyos morfológiai defektusokat okoz. (2) A csökkent dózis a border sejtek, ill. az MDA-MB231T invazív emlőkarcinóma sejtvonal migrációjához vezet, míg a fél dózis (heterozigóták) ektopikus trachea és DTC sejt migrációt eredményez. (3) A megnövekedett dózis pedig csökkenti az invazív sejtek migrációs potenciálját, ill. a migráló sejtek vándorlását (DTC, trachea), vagy akár meg is állíthatja azokat (border sejtek). A táblázatban a *C. elegans*-hoz köthető megfigyeléseket félkövér kiemeléssel jelöltem.

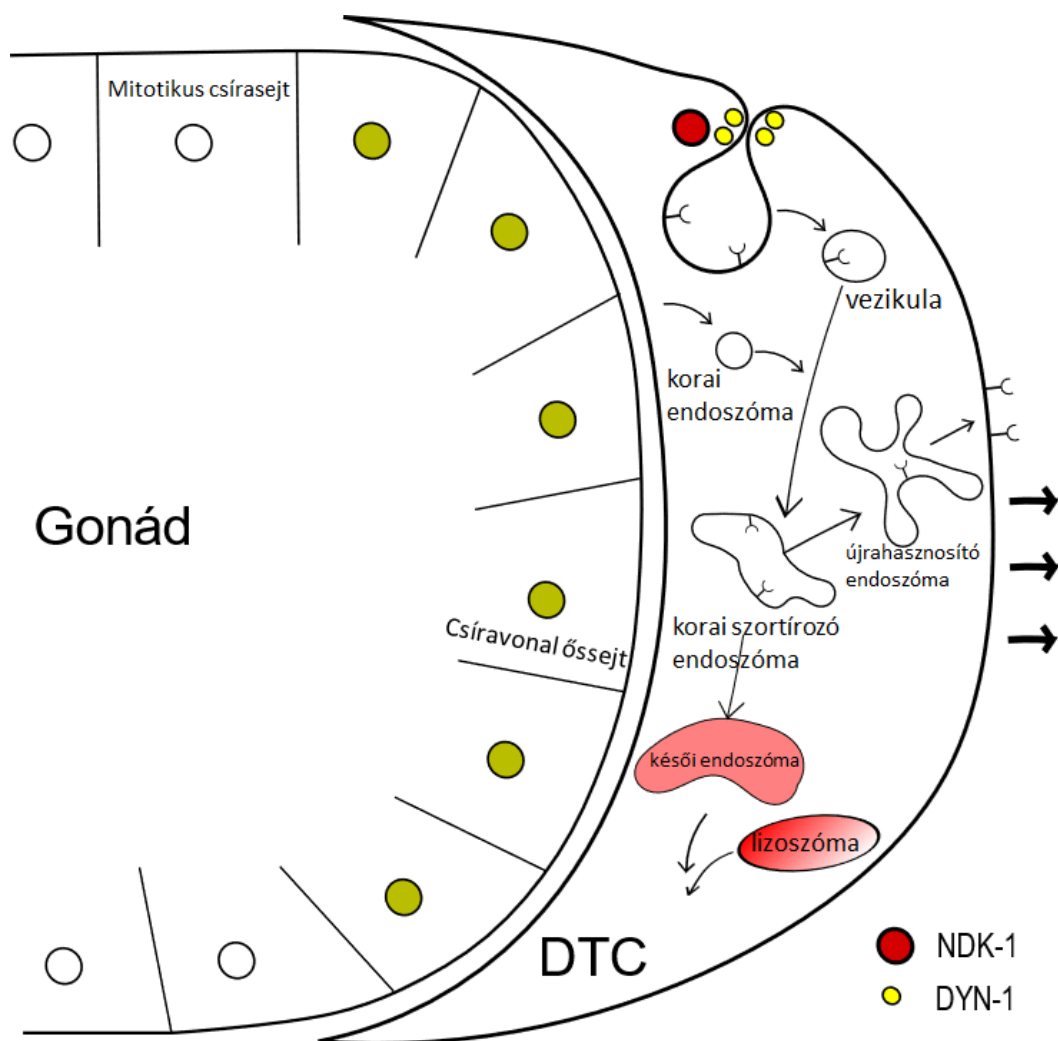
Ha az általunk megfigyelték mellé „állítjuk” a *Drosophila* trachea morfogenezisét, hasonló sémát látunk: mindkét modellben NDPK hiányában inkomplett migrációt, míg heterozigótákban a fél dózis esetén ektopikus migrációt kapunk (1. táblázat). Ugyanis *Drosophila*-ban az *awd*+/- heterozigótákban ektopikus tracheaágak jelennek meg, míg az *awd*-/- homozigótákban a tracheafejlődés komplett zavara látható. Szintén ecetmuslicából származik a border sejtek dóziszfüggő migrációja: míg a környező follikuláris sejteknél kisebb dózisé AWD szükséges a migrációjukhoz, addig az AWD hiánya és megnövekedett dózisa is megrekeszti vándorlásukat.

Drosophilában jól ismert a mechanizmus, ahogy az AWD a trachea és a border sejtek migrációjára hat: lokálisan látja el GTP-vel az ecetmuslica dynamint, mely endocitikus funkcióján keresztül szabályozza a migráló sejtek felszínén a kemotaktikus receptorszinteket (FGFR a trachea, és Pvr a border sejtek esetében) (Vincent Dammai és mtsai., 2003; Nallamothe és mtsai., 2008). Az AWD csökkent funkciója következtében a homo- és heterozigótákban egyaránt megnövekedett a trachea sejtek felszínén a *breathless*/FGFR szintje (Vincent Dammai és mtsai., 2003), ez azonban eltérő fenotípushoz vezet: a homozigóta *awd* -

/- mutánsok sejt felszínén túlhalmozódik a receptorok mennyisége, mely a sejtek véletlenszerű irányválasztásához és kismértékű migrációjához vezet, ami az irányt adó jelek szimmetrikus (minden irányból való) érzékeléséből következik, ez vezet a fejletlen tracheahálózathoz. Heterozigótákban kisebb mértékű a receptorok felhalmozódása, így az esetek többségében kifejlődik a tracheahálózat, azonban a többlet receptornak köszönhetően további ektopikus ágakat is fejleszt (véltetően hasonló jelenség vezet a DTC-k irányvesztéséhez *ndk-1* +/- heterozigótákban is). A fentiekhez hasonlóan az *awd* kiütése S2-es ecetmuslica sejt vonalban szintén megnövekedett sejt felszíni FGFR szinthez vezet (Vincent Dammai és mtsai., 2003).

A border sejtek alacsonyabb AWD szintje biztosítja migrációjukat az oocita epitéliumától az anterior pólus felé (Nallamothu és mtsai., 2008). Az AWD kiütésekor és túltermelésekor is megáll ezen sejtek migrációja. AWD túltermeléskor csökken a border sejtek felszínén a Pvr szintje, míg AWD hiányában megnövekszik annak mennyisége a felszínen. Az AWD különböző dózisa által kiváltott Pvr szintek közvetítette fenotípusok összezsengenek egy korábbi mérésel: a Pvr túltermeléskor egyhelyben pörögnek a border sejtek (mivel nem képesek a kemotaktikus jelek irányultságának meghatározására), míg a Pvr kiütésekor egyáltalán nem mozognak a sejtek, mivel ekkor inaktív a Pvr jelátvitel (Duchek és mtsai., 2001; McDonald és mtsai., 2003).

C. elegans-ban az NDK-1 DTC migrációjára kifejtett mechanizmusa még nem ismert, azonban a fonálféreg dynamin, a DYN-1 hatása a DTC migrációra ismert (Cram és mtsai., 2006), továbbá csoportunk kimutatta az NDK-1 és DYN-1 kapcsolatát (Fancsalszky és mtsai., 2014; Farkas és mtsai., 2019), mely alapján feltételezhetően ebben az esetben is az NDK-1/DYN-1 által vezérelt endocitózis szabályozza a DTC migrációban érintett kemotaktikus receptorok szintjét (32. ábra). A legvalószínűbb jelöltek az integrin receptorok, mivel az NDK-1-hez hasonlóan ezek is a DTC migráció dorzális fázisában fejtik ki hatásukat (Wong és mtsai., 2012). A fonálféreg β -integrin, a *pat-3* funkcióvesztése az *ndk-1*-hez hasonló, „J” alakú gonádkart alakít ki (Cram és mtsai., 2006), így a β -integrin egy esélyes jelölt a DTC felszínén, melynek szintjét befolyásolhatja az NDK-1/DYN-1 aktivitása.



32.ábra. Az NDK-1 a DYN-1-el karöltve a receptor reciklizáció folyamatán keresztül szabályozhatja a DTC migrációját (Farkas és mtsai., 2018 nyomán)

A DTC-k félhold alakú vezérsejtek, melyek a *C. elegans* gonádkarok csúcsán helyezkednek el, vándorlásuk irányát vastagon szedett nyilak jelzik. A DTC-k felszínén adott mennyiségű kemotaktikus receptor szükséges a gonádfejlődés megfelelő szakaszaiban a helyes útvonal bejárásához. Feltételezésünk szerint a receptor internalizáció folyamata határozza meg a sejtfelszíni receptorok (pl. a DTC migráció dorzális fázisában az integrinek és netrinek) mennyiségét. Az NDK-1 kapcsolata a DYN-1-el több szinten is bizonyításra került, valószínűsíthetően az NDK-1 NDPK aktivitásának köszönhetően GTP-vel látja el a DYN-1-et, így lehetővé teszi e molekuláris motor hatékony működését a membránátrendezési folyamatok során. A DYN-1 membránvágó aktivitásának következtében receptorokat is tartalmazó endocitikus vezikulák jutnak a sejtbe, melyek a korai endoszómákkal fuzionálnak, amik ezzel szortírozó endoszómákká alakulnak. Az itteni szortírozás következtében az endoszómák fuzionálhatnak a lizoszómákkal, mely többek között a receptorok degradációjához vezet, vagy a receptorok újra felhasználásra kerülnek, mely esetben visszakerülnek a sejtfelszínre.

Célunknak megfelelően megvizsgáltuk, hogy az NDK-1 különböző dózisaiként hatnak a DTC-k migrációjára. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az NDK-1 dózisfüggően befolyásolja a DTC migráció folyamatát (1. táblázat). A *C. elegans* DTC migrációján tett megfigyeléseink, ill. a *Drosophila* border- és tracheasejt migrációján alapuló megfigyelések között számos ponton átfedést láthatunk, melyet támogat az NDK-1 humán környezetben (invazív emlőkarcinóma sejtekben) való, homológjainak megfelelő működése. Mindezek alapján az NDPK-k dózisfüggő hatása a sejtmigrációja univerzálisnak mondható. A háttérben zajló folyamatok ecetmuslicában jól definiáltak, miszerint az AWD a dynamin-mediált endocitózisban betöltött szerepén keresztül hat a receptor internalizációra, és így a sejtmigrációra. *C. elegans*-ban a pontos mechanizmus, amelyen keresztül az NDK-1 a DTC migrációt befolyásolja, még nem ismert. Azonban az NDPK-k és a dynaminok kapcsolata alapján nagy eséllyel itt is az ecetmuslicához hasonló folyamatról lehet szó, mely során az integrinek és netrinek reciklizációját befolyásolja, amik jól definiált receptorai a DTC migrációnak (Wong és mtsai., 2012).

Nagyban támogatja elképzelésünket, hogy a fentiekén túl más, szintén membrándinamikai folyamatokra is hat a két fehérje kapcsolata, melyet több modellből származó adat is alátámaszt, melyhez a mi laborunk eredményei is hozzájárulnak. Ez az apoptotikus testek bekebelezése, ill. a tágabb értelemben vett fagocitózis folyamata, mely nagyobb molekulák internalizációját biztosítja, legyen az akár mikroorganizmus, akár elhalt sejtek maradványa(i) (melyek eltakarítása fejlődés és tumorbiológiai szempontból is fontos) (Marie-Anaïs és mtsai., 2016). A bekebelezendő részecske körüli membránmegnyúlást a citoszkeleton aktin vázának átrendezése adja. Nemrég nyert bizonyítást, hogy a fagoszóma kialakulását és záródását szolgáló aktin átrendezési folyamatokban fontos szerep jut a DYN-1 GTPáz-nak (Gold és mtsai., 1999; Marie-Anaïs és mtsai., 2016). Mivel a sejtekben a GTP szint jóval alacsonyabb az ATP-énél, az NDPK-knak kulcsszerep jut a dynaminok GTP-vel való lokális ellátásában: például az NME1 és dynamin-2 esetében az endocitózis folyamatában (Boissan és mtsai., 2014). Ezidáig az NDPK-k apoptotikus bekebelezésben betöltött szerepe nem volt ismert egyik modellrendszerben sem, míg csoportunk nem kötötte az NDK-1-et ehhez a folyamathoz: NDK-1 hiányában és csendesítésekor is megnövekedett az eltakarítatlan/bekebelezetlen apoptotikus sejtek mennyisége a gonádban és az embriókban. Erre a megfigyelésünkre alapozva folytattuk munkánkat *C. elegans*-ban, melyben az apoptotikus bekebelezés genetikai útvonalai jól karakterizáltak (Conradt és mtsai., 2016). A DYN-1 membránátrendező aktivitásán keresztül már ismert és esszenciális komponense az apoptotikus

eltakarítás mindkét folyamatának: a bekebelezésnek és az eliminációnak, azonban a dynamin-NDPK kapcsolat pontos szerepe ebben a folyamatban még feltárássra várt. IP-MS ill. irányított CO-IP kísérletekben kimutattuk a két fehérje egy komplexben való jelenlétét a nematódában. Ezt *in situ* DPLA-el is kimutattuk, mely jelölést comma állapotú embriókon végeztük, mivel ebben a fejlődési állapotban a legkifejezettebb a szomatikus sejtek apoptózisa az egyedfejlődés során. Azt is kimutattuk, hogy az NDK-1 a bekebelezésen túl szintén részt vesz a fagoszóma érés korai szakaszában, ugyanis a fagoszóma felszínén lokalizálódik, ugyanabban az időablakban, melyben a DYN-1 is jelen van, ráadásul DPLA vizsgálattal ko-lokalizációjukat is megfigyeltük, mely tovább erősíti eredeti feltételezésünket, miszerint az NDK-1 is lokális GTP ellátója lehet a DYN-1-nek. A DYN-1-ről már jó ideje tudjuk, hogy a CED-1-től downstream hat, és egy korai faktora a fagoszóma kialakulásnak és érésnek. A legutóbb elvégzett valósidejű mikroszkópiás mérésünk során tapasztalt dinamikus DYN-1 felhalmozódás a fagoszóma felszínen egybevág a korábbi megfigyelésekkel; mihelyst ellátta feladatát, leválik a fagoszóma felszínéről. Ennek megfelelően, mint pozitív regulációs partnere, az NDK-1 is a DYN-1-éhez hasonló dinamikus felhalmozódást mutat, majd a DYN-1-el egyidőben válik le a fagoszóma felszínéről.

Szerettük volna bizonyítani, hogy az NME1 homológok apoptotikus bekebelezésben betöltött szerepe konzervált, ezért humán és egér makrofágokban is végeztünk vizsgálatokat, melyeknek egy része a humán dynamin-2 és NME1 kapcsolatának konzerváltságára irányult. Először ko-lokalizációjukat mutattuk ki humán makrofágokban, szintén a DPLA módszerrel. Majd a két (endogén) fehérje expressziójának vizsgálatakor a bekebelezés folyamata alatt együttes toborzásukat figyeltük meg a fagocitikus kupáknál. Az NME1 csendesítése humán makrofágokban (hMDM) csökkentette azok fagocitikus kapacitását: a kontroll makrofágokhoz képest kevesebb IgG-vel opsonizált részecskét vettek fel. Ugyanezt a funkciót vizsgáltuk egérben is: azok a BMDM sejtek, melyekben csendesítettük az NM23-M1-et, szintén szignifikánsan kevesebb apoptotikus timocitát voltak képesek eltakarítani. Fontos kiemelni, hogy a különböző részecskék -mint az apoptotikus sejtek, vagy opsonizált patogének- makrofágok általi fagocitózist egy komplex szignalizációs hálózat szabályoz, melyet a bekebelezés fajtájától függően más-más receptorok indítanak be. A különböző kezdeti iniciációs útvonalak végül az aktin sejtvázas hálózat átrendezésén, a fagoszóma kialakításán, záródásán és érésén konvergál.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az apoptotikus bekebelezés, illetve tágabb értelemben a fagocitózis evolúciósan konzervált pozitív szabályzó az NME1 homológok: hiányuk vagy csökkent dózisuk mind a fonálféregben, mind egérben ill. emberben csökkenti a

specializált fagocita sejtek bekebelező kapacitását, melyet több különböző fagocita modellben is igazoltunk.

Továbbra is kérdés maradt, hogy pontosan miként hatnak a fagocitózisra az NDPK-k, ill. a dynaminnal való kapcsolatuk. Ezért partnerünk, Florence Niedergang csoportja megvizsgálta, milyen hatása van a dynamin toborzására az NME1 csendesítésének. Ugyan kirajzolódott egy tendencia, miszerint kevesebb dynamin-2 volt jelen a fagocitikus régióban, legfőképp azért, mert az NME1 csendesített sejtekben eleve kevesebb fagocitikus kupá volt kimutatható. Ez megnehezítette az F-aktin kupáknál lévő dynamin-2 kvantifikálását, mivel egyrészt ezekben a sejtekben a kevesebb fagocitikus kupá a dynamin-2 mellett a többi, a fagocitózis korai komponenséből is kevesebb lesz jelen, melyek szintén hatással vannak a dynamin-2 toborzására, másrészt az esetlegesen kevésbé hatékonyan csendesített sejtek jól detektálható fagocitikus kupái torzítják a mérés eredményét, mellyel alul becsülnénk az NME1 hatását. Így, mivel eredményeink tartalmazhatnak bizonyos mértékű bizonytalanságot, illetve ebben a formában statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak, nem közöltük őket. Ettől függetlenül a mért trend alapján kijelenthetjük, hogy az NME1 egy fontos faktora az F-aktin-jelölt fagocitikus kupá kialakulásának.

Fontos megemlíteni, hogy az NME1 dynamin-2-re gyakorolt hatására -a szintén membránátrendezéssel járó,- az endocitózis folyamatában a mi cikkünk megjelenésével majdnem egyidőben derült fény, melyet Patricia Steeg, az NME1 metasztázis szuppresszor hatásának leírója tárt fel (Khan és mtsai., 2019). A korábbi, ecetmuslicából származó, receptor-mediált endocitózis (mely folyamat szerepét sejtjük a DTC migráció mögött is) lehet az egyik fontos, NDPK-k által befolyásolt tumorprogressziót visszafogó folyamat. Kísérleteikben kimutatták, hogy invazív emlőkarcinóma sejtvonalakban (MDA-MB-231T és MDA-MB-435) az NME1 ill. NME2 túltermelése egyaránt a sejtek motilitásának csökkenésén túl megnövekedett transzferrin és EGF receptor endocitózishoz vezet: ezzel befolyásolva a migrációhoz, motilitáshoz és áttétképzéshez szükséges jelpályákat. Ami még fontosabb, hogy az NME1 és NME2 az endocitózisban betöltött szerepét a dynamin-2-n keresztül látja el: szükségesek annak oligomerizációjához. Így hosszú idő után fény derült arra, miért NDPK-függő a dynaminok funkcionalitása. Ez a megfigyelés lehet a magyarázata annak, hogy az NME1 csendesítésekor miért detektáltunk kevesebb fagocitikus kupát; egyrészt a dynamin-2 nem képes ellátni funkcióját, másrészt nem képes a további endocitózis komponensek toborzására.

Az általunk feltárt, és mélyebben vizsgált NDPK-k szerepe az apoptotikus eltakarításban a fejlődésbiológiai jelentőségén túl a tumorprogresszióra is hatással lehet.

Ugyanis jópár éve ismert, hogy az eltakarítatlan apoptotikus testek felhalmozódása gyulladásához vezethet (Martinez és mtsai., 2011). A kialakult gyulladás pedig kedvező környezetet ad a tumor progressziójához (Hanahan és Weinberg, 2011). Így az általunk feltárt, NDPK-k apoptotikus bekebelezésben betöltött szerepe kulcsfontosságú lehet az immunrendszer támogatásában a tumorok elleni védekezésben. Emiatt egy lehetséges terápiás alkalmazás reményében kíváncsiak voltunk, hogy az NDPK-k túlermelletése makrofág sejtvonalakban (THP-1 és U937) növeli-e azok fagocitikus kapacitását. Ahogy az eredmények fejezetben bemutatásra került, számos módszerrel, több alkalommal is sikeresen transzfektáltuk az U937 sejtvonalat, mely nagy valószínűséggel a megnövekedett NDPK dózissra reagált rosszul. Feltételezésünket támogatja, hogy csoportunk egy párhuzamos projektben erős NME1 jelet detektált pleurális mezoteliómát körülvevő makrofágokban, így valószínűsíthető, hogy magasabb bennük az NME1 szintje. A jövőben továbbra is szeretnénk az NDPK-k szintjét modulálni makrofágokban, azonban nem transzgének bevitelével emelnénk az NDPK-k dózisát, hanem kis aktivátor molekula (NMac1) megfelelő dóziséval szabályoznánk finoman a makrofágok endogén NME1 szintjét (Lee és mtsai., 2018).

Összességében eredményeink - Steeg csoportjának friss tanulmányával karöltve -közelebb visznek az NDPK-k által közvetített metasztázis gátló hatás mechanizmusának jobb megértéséhez. Az *nme* géncsalád tagjai és interakciós partnereik potenciális gyógyszer célpontok. Számos ráktípusban (pl. melanóma, mellrák, stb.) az NME alacsony expressziója a rossz prognózis jele. Ezért fontos, hogy ismereteinket bővítsük az NDPK-k szabályozásáról, ill. leszabályozásáról a tumorokban. Csoportunk erre is tesz erőfeszítéseket a jövőben: az egykópiás NDK-1::GFP transzgént kifejező törzsünket EMS mutagenézisnek vetjük alá, és teljes genomszekvenálással szeretnénk azonosítani az NDK-1 upstream regulátorait. Azokat a vonalakat tervezzük szekvenáltatni, melyekben előzetesen az NDK-1::GFP intenzitásában változást tapasztalunk. További tervünk az NDK-1 újabb interakciós partnereinek azonosítása. Jelenleg a GDH-1 egy ígéretes jelölt, de továbbiak szűrése is folyamatban van, különös tekintettel az apoptotikus bekebelezés folyamatában érintett találatokra. Végezetül szintén a jövőben elvégzendő feladat lesz a Kritikus His¹¹⁸-hoz köthető funkció(k), ill. a humán NME1 működésének *C. elegans*-ban való vizsgálatának befejezése. Az ehhez szükséges vad, ill. pontmutáns törzsek a mosSCI módszerrel csak nemrég készültek el, a keresztezéseket a közeljövőben fogjuk elvégezni. Ezekben a kísérletekben arra keressük a választ, hogy az NDK-1 kritikus, 118-as pozícióban lévő hisztidinje mely, az NDK-1 által befolyásolt folyamatokra van hatással, ill., hogy az NDK-1 hiányát humán

ortológja, az NME-1 kompenzálja-e, ezzel is bizonyítva az NDK-1 fehérje, és ezáltal a hozzá kötött, *C. elegans*-ban megfigyelt konzerváltságát.

Az NME biológiai funkcióinak (apoptózisban, sejtmigrációban betöltött szerepének), rájuk ható szabályzóknak (transzkripció, transláció és poszttranszláció szinten), valamint interakciós partnereinek megismerése hozzájárulhat az áttétképződés folyamatának jobb megértéséhez, esetleges új terápiás alkalmazás kifejlesztéséhez. Ez különösen fontos, mivel eddig az NME1-re nem sikerült terápiás hatóanyagot fejleszteni. Több jelölt is felmerült az idők során, mint például az MPA (medroxy-progeszteron), mely egérben még ígéretesen csökkentette a metasztázis kialakulását, azonban a kezelt nőkben sajnos nem bizonyult hatékonynak a metasztatikus mellrák kialakulása ellen (Miller és mtsai., 2014; Palmieri és mtsai., 2005).

Ugyan a sejt felszíni receptorok endocitózisa (és így a sejtmigráció szabályzásának egy része), és a fagocitózis (kiemelve az apoptotikus sejtek bekebelezését) elsőre különböző folyamatoknak tűnnek, mégis számos ponton átfednek. Egyrészt mindkettő olyan membránátrendezési folyamat, mely a sejt aktinvázának átszervezésével jár, ill. a sejtmembrán felszínének megnyúlását is igénylik. Számos modellben sikerült az NDPK-kat ezekhez a folyamatokhoz kötni, sugallva, hogy univerzális funkcióról van szó. Mostani tudásunk alapján az NDPK-k direkt fehérje-fehérje kapcsolaton keresztül közvetlen univerzális GTP ellátói a dynaminoknak, melyek kulcsszerepe ezekben a folyamatokban régóta ismert. NDPK hiányában a dynaminok aktivitása csökken (részben a szegényebb GTP ellátottság miatt), mely redukált membránbetűródéshez vezet, ezáltal befolyásolva a sejt felszíni receptorok szintjét, illetve apoptotikus bekebelezéskor a fagocitikus kupák kialakulását. A legújabb adatok alapján ezen a funkción túl a dynamin komplex összeállását is az NDPK-k segítik. Az NDPK-k sejtmigrációra gyakorolt hatása dózisfüggőnek bizonyult, amire több modellorganizmusban is találunk bizonyítékot, mely jelenségre csoportunk világított rá markánsabban először. Ez a dózisfüggés azonban a bekebelező sejteket is érintheti, ez még további vizsgálatokat igényel.

Eredményeink alapján körvonalazódni látszik az a hipotézis, hogy az NDPK-k univerzális partnerei a dynaminoknak a membránátrendezési folyamatok során (különös tekintettel az endocitózis folyamatára), egyrészt GTP-vel látják el azokat, másrészt felelős azok összeállásáért oligomerekké. Ez az NDPK hatás pedig dózisfüggő, így az esetlegesen kialakuló aberráns NDPK dózis helyreállítása ígéretes terápiás perspektíva lehet, ill. fontosságából adódóan az NDPK/dynamin interakció helyreállítása is hozhat eredményeket.

9 Összefoglalás

Az áttétek (metasztázisok) nagymértékben hozzájárulnak a megbetegedésekhez köthető elhalálozásokhoz. Az NME1 az elsőként azonosított metasztázis szuppresszor fehérje, mely hatásának mechanizmusáról az intenzív kutatások ellenére még keveset tudunk.

Az *nme* géncsalád funkcióit fonálféreg genetikai modellrendszeren illetve humán sejtvonalakon vizsgáltuk. Csoportunk új biológiai folyamathoz társította a humán NME1 fehérjét, illetve *C. elegans* homológját, az NDK-1-et: a programozott sejthalállal elpusztult sejtek eltávolítását segítik, ill. köthetők a fagocitózishoz is. Ezt mind nematódában, mind humán sejtvonalon sikerült kimutatni. Emellett az NDK-1-ről is elmondhatjuk, hogy szerepe van a sejtvándorlásban: befolyásolja a DTC-k migrációját, ill. humán invazív emlőkarcinóma sejtvonalban ellátja a humán ortológjához (NME1) kötött migrációs potenciált csökkentő hatást.

Mindkét általunk vizsgált folyamat kulcsfontosságú az áttétképződés megakadályozásában. A háttérükben zajló mechanizmusok (citoszkeleton átrendezés, membránfelszín megnyúlása, vezikula ill. fagoszóma képzés) feltárásakor az NDK-1/NME1 és DYN-1/dynamin fehérjék (mely egy kulcsfehérjéje a membránátrendezési folyamatoknak) közötti kapcsolat esszenciálisnak bizonyult. Kapcsolatukat több szinten is azonosítottuk az általunk vizsgált modellekben: eleinte genetikai interakciót állapítottunk meg köztük a fonálféregben, majd fehérje szinten *in vitro* (CO-IP, IP-MS), *in situ* (DPLA *C. elegans* embrió bekebelező sejtjeiben és humán makrofágokban), és *in vivo* (ko-lokalizáció *C. elegans* embrió bekebelező sejtjeiben és humán makrofágokban). Mivel a fonálféreg túl többféle modellben is kimutatták ezen fehérjék kapcsolatát, így kijelenthetjük, hogy univerzális, és a membránátrendezési folyamatokat érintő esszenciális kapcsolatról van szó.

Továbbá kimutattuk, hogy az NDK-1/NME1 bizonyos biológiai funkcióinak (legfőképp a sejtmigrációra gyakorolt hatásuk) ellátása mennyire függ azok megfelelő dózisától. A megfigyelés jelentőségét adja, hogy egyrészt áttétképzéskor csökken az NME1 mennyisége a tumoros sejtekben, másrészt egyes modellorganizmusokban már ismertek olyan sejt típusok, melyek migrációjához szükséges az NDPK dózisának megváltozása. Elképzelésünk alapján a DTC-k által megtett utat, és annak irányultságát az NDK-1 -az ecetmuslicában és humán sejtvonalakban megfigyelteknek megfelelően- a sejtmigráció szignalizációs útvonalait irányító receptorainak sejt felszíni mennyiségét befolyásolhatja a receptor reciklizáción keresztül.

10 Summary

Metastases contribute significantly to disease-related deaths. NME1 (non-metastatic-1) is the first identified metastasis suppressor protein, despite intensive research, its mechanism of action remains to be determined.

The functions of the *nme* gene family were investigated by our group in human cell lines and in the nematode model system. We linked a novel biological process to human NME1 and its *C. elegans* homolog NDK-1: they function in the clearance (e.g. engulfment and degradation) of apoptotic cells, thus they have a conserved role in phagocytosis. We demonstrated this observation in the nematode and in human cells as well. In addition, we can say, that NDK-1 has also a role in cell migration by influencing the migration of gonadal distal tip cells (DTCs), furthermore, similar to its human ortholog (NME1) it inhibits the migratory potential of invasive breast carcinoma cells.

The processes of cell migration and elimination of dying cells are key elements of the metastatic cascade. During exploring the underlying mechanisms (cytoskeletal rearrangement, membrane surface elongation, vesicle and phagosome formation) the connection between NDK-1/NME1 and DYN-1/dynamin (a key component of membrane remodelling events) turned out to be essential. We identified their relationship in several levels in both models: first, we observed a genetic interaction in the worm, followed by their analysis at the protein level *in vitro* (CO-IP, IP-MS), *in situ* (DPLA in the engulfing cells of *C. elegans* embryos and human macrophages), and *in vivo* (co-localisation in the engulfing cells of *C. elegans* embryos and human macrophages). Because the relationship of these two proteins has been known from several other models, we can say, that their interaction is universal and essential during membrane remodelling events.

Furthermore, we showed that the fulfilment of certain biological functions of NDK-1 / NME1 (mainly their effect on cell migration) depends on their proper dosage. The significance of this observation on one hand is given by the known fact, that the amount of NME1 in tumor cells is reduced during metastasis, and on the other hand, certain cell types -known from other models- require the change in the dosage of NDPK to gain the ability to migrate. In our understanding the path taken by the DTCs and their orientation relies on the ability of NDK-1, by which – corresponding to the observations from the fruit fly and human cell lines – it affects chemotactic receptor levels on the surface of migrating cells through receptor recycling.

11 Köszönetnyilvánítás

Az évek alatt az ELTE- és MTA TTK számos tanszékén/intézetében végeztem méréseket, a doktorandusz hallgatói időszakban számos előadás, ill. tanóra keretében bővíthettem ismereteimet, és mint az a dolgozatban látszik, kollaborációs partnerekben is bővelkedünk. Ezért egy hosszú felsorolás helyett- amiből sajnos jó eséllyel hagynék ki arra érdemes munkatársat/oktatót- kollektíven mindenkinek, aki bármilyen formában is hozzájárult/támogatott a dolgozat elkészítéséhez vezető rögzös úton, nagy köszönettel és hálával tartozom, amit remélhetőleg pályám további szakasza alatt viszonzni tudok!

12 Irodalomjegyzék

- Affolter Markus, Caussinus Emmanuel, Emoto H., Itoh N. és Hogan B. L. (2008): **Tracheal branching morphogenesis in Drosophila: new insights into cell behaviour and organ architecture..** *Development (Cambridge, England)*. 135, 12.: 2055–64. ISSN: 0950-1991
- Alberts Bruce (2010): **Cell biology: the endless frontier..** *Molecular biology of the cell*. 21, 22.: 3785. ISSN: 1939-4586
- Alcazar Rosa M., Lin Rueyling és Fire Andrew Z. (2008): **Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans..** *Genetics*. 180, 3.: 1275–88. ISSN: 0016-6731
- Anthis Nicholas J., és Campbell Iain D. (2011): **The tail of integrin activation.** *Trends in Biochemical Sciences*. 36, 4.: 191–198. ISSN: 09680004
- Antonny Bruno, Burd Christopher, De Camilli Pietro, Chen Elizabeth, Daumke Oliver, Faelber Katja, Ford Marijn, Frolov Vadim A., Frost Adam, Hinshaw Jenny E., Kirchhausen Tom, Kozlov Michael M., Lenz Martin, Low Harry H., McMahon Harvey, Merrifield Christien, Pollard Thomas D., Robinson Phillip J., Roux Aurélien és Schmid Sandra (2016): **Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know.** *The EMBO Journal*. 35, 21.: 2270–2284. ISSN: 0261-4189
- Arandjelovic Sanja, és Ravichandran Kodi S. (2015): **Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis.** *Nature immunology*. 16, 9.: 907. ISSN: 1529-2916
- Attwood Paul V, és Wieland Thomas (2015): **Nucleoside diphosphate kinase as protein histidine kinase..** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 388, 2.: 153–60. ISSN: 1432-1912
- Bacac Marina, és Stamenkovic Ivan (2008): **Metastatic cancer cell..** *Annual review of pathology*. 3. 221–47. ISSN: 1553-4006
- Bae Young-Ki, Sung Jee Young, Kim Yong-Nyun, Kim Sunshin, Hong Kyeong Man, Kim Heung Tae, Choi Min Sung, Kwon Jae Young és Shim Jaegal (2012): **An in vivo C. elegans model system for screening EGFR-inhibiting anti-cancer drugs..** (A. C. Hart, szerk.) *PloS one*. 7, 9.: e42441. ISSN: 1932-6203
- Bai Ling, Yang Howard H., Hu Ying, Shukla Anjali, Ha Ngoc-Han, Doran Anthony, Faraji Farhoud, Goldberger Natalie, Lee Maxwell P., Keane Thomas és Hunter Kent W. (2016): **An Integrated Genome-Wide Systems Genetics Screen for Breast Cancer Metastasis Susceptibility Genes..** *PLoS genetics*. 12, 4.: e1005989. ISSN: 1553-7404

Balklava Zita, Pant Saumya, Fares Hanna és Grant Barth D. (2007): **Genome-wide analysis identifies a general requirement for polarity proteins in endocytic traffic.** *Nature Cell Biology*. 9, 9.: 1066–1073. ISSN: 1465-7392

Bandyopadhyay Sucharita, Zhan Rui, Chaudhuri Asok, Watabe Misako, Pai Sudha K., Hirota Shigeru, Hosobe Sadahiro, Tsukada Taisei, Miura Kunio, Takano Yukio, Saito Ken, Pauza Mary E., Hayashi Sunao, Wang Ying, Mohinta Sonia, Mashimo Tomoyuki, Iizumi Megumi, Furuta Eiji és Watabe Kounosuke (2006): **Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression.** *Nature Medicine*. 12, 8.: 933–938. ISSN: 1078-8956

Bell Graham P., és Thompson Barry J. (2014): **Colorectal cancer progression: lessons from Drosophila?.** *Seminars in cell & developmental biology*. 28. 70–7. ISSN: 1096-3634
Beyenbach K. W., és Wieczorek Helmut (2006): **The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation.** *Journal of Experimental Biology*. 209, 4.: 577–589. ISSN: 0022-0949

Bilitou Aikaterini, Watson Julie, Gartner Anton és Ohnuma Shin-ichi (2009): **The NM23 family in development.** *Molecular and Cellular Biochemistry*. 329, 1–2.: 17–33. ISSN: 0300-8177

Boissan Mathieu, Dabernat Sandrine, Peuchant Evelyne, Schlattner Uwe, Lascu Ioan és Lacombe Marie-Lise (2009): **The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement..** *Molecular and cellular biochemistry*. 329, 1–2.: 51–62. ISSN: 1573-4919

Boissan Mathieu, De Wever Olivier, Lizarraga Floria, Wendum Dominique, Poincloux Renaud, Chignard Nicolas, Desbois-Mouthon Christèle, Dufour Sylvie, Nawrocki-Raby Béatrice, Birembaut Philippe, Bracke Marc, Chavrier Philippe, Gespach Christian és Lacombe Marie-Lise (2010): **Implication of metastasis suppressor NM23-H1 in maintaining adherens junctions and limiting the invasive potential of human cancer cells..** *Cancer research*. 70, 19.: 7710–22. ISSN: 1538-7445

Boissan Mathieu, Montagnac Guillaume, Shen Qinfang, Griparic Lorena, Guitton Jérôme, Romao Maryse, Sauvonnet Nathalie, Lagache Thibault, Lascu Ioan, Raposo Graça, Desbordes Céline, Schlattner Uwe, Lacombe Marie-Lise, Polo Simona, van der Bliek Alexander M., Roux Aurélien és Chavrier Philippe (2014): **Membrane trafficking. Nucleoside diphosphate kinases fuel dynamin superfamily proteins with GTP for membrane remodeling..** *Science (New York, N.Y.)*. 344, 6191.: 1510–5. ISSN: 1095-9203

Boissan Mathieu, Wendum Dominique, Arnaud-Dabernat Sandrine, Munier Annie, Debray

Marcel, Lascu Ioan, Daniel Jean-Yves és Lacombe Marie-Lise (2005): **Increased Lung Metastasis in Transgenic NM23-Null/SV40 Mice with Hepatocellular Carcinoma.** *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 97, 11.: 836–845. ISSN: 1460-2105

Bosnar Maja Herak, Bago Ruzica és Cetković Helena (2009): **Subcellular localization of Nm23/NDPK A and B isoforms: a reflection of their biological function?.** *Molecular and cellular biochemistry*. 329, 1–2.: 63–71. ISSN: 1573-4919

Braun Virginie, Fraissier Vincent, Raposo Graça, Hurbain Ilse, Sibarita Jean-Baptiste, Chavrier Philippe, Galli Thierry és Niedergang Florence (2004): **TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages..** *The EMBO journal*. 23, 21.: 4166–76. ISSN: 0261-4189

Brenner S. (1974): **The genetics of Caenorhabditis elegans..** *Genetics*. 77, 1.: 71–94. ISSN: 0016-6731

Bucci C., Parton R. G., Mather I. H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B. és Zerial M. (1992): **The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway..** *Cell*. 70, 5.: 715–28. ISSN: 0092-8674

Bucci C., Thomsen P., Nicoziani P., McCarthy J. és van Deurs B. (2000): **Rab7: a key to lysosome biogenesis..** (S. R. Pfeffer, szerk.) *Molecular biology of the cell*. 11, 2.: 467–80. ISSN: 1059-1524

Burridge K., CHRZANOWSKAWODNICKA M. és ZHONG C. (1997): **Focal adhesion assembly.** *Trends in Cell Biology*. 7, 9.: 342–347. ISSN: 09628924

C. elegans Sequencing Consortium (1998): **Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology..** *Science (New York, N.Y.)*. 282, 5396.: 2012–8. ISSN: 0036-8075

Cabello Juan, Neukomm Lukas J., Günesdogan Ufuk, Burkart Katharina, Charette Steve J., Lochnit Günter, Hengartner Michael O. és Schnabel Ralf (2010): **The Wnt Pathway Controls Cell Death Engulfment, Spindle Orientation, and Migration through CED-10/Rac.** (B. Conradt, szerk.) *PLoS Biology*. 8, 2.: e1000297. ISSN: 1545-7885

Carotenuto Marianeve, de Antonellis Pasqualino, Chiarolla Cristina Maria, Attanasio Carmela, Damiani Valentina, Boffa Iolanda, Aiese Nadia, Pedone Emilia, Accordi Benedetta, Basso Giuseppe, Navas Luigi, Imbimbo Ciro és Zollo Massimo (2015): **A therapeutic approach to treat prostate cancer by targeting Nm23-H1/h-Prune interaction.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 388, 2.: 257–269. ISSN: 0028-1298

Carvalho Tiago Ma, Cardoso Henrique J., Figueira Marília I., Vaz Cátia V és Socorro Sílvia (2019): **The peculiarities of cancer cell metabolism: A route to metastasization and a**

target for therapy.. *European journal of medicinal chemistry.* 171. 343–363. ISSN: 1768-3254

Cereijido M., Contreras R. G. és Shoshani L. (2004): **Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans..** *Physiological reviews.* 84, 4:. 1229–62. ISSN: 0031-9333

Ćetković Helena, Bosnar Maja Herak, Perina Drago, Mikoč Andreja, Deželjin Martina, Belužić Robert, Bilandžija Helena, Ruiz-Trillo Iñaki és Harcet Matija (2018):

Characterization of a group I Nme protein of Capsaspora owczarzaki-a close unicellular relative of animals.. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 98, 3:. 304–314. ISSN: 1530-0307

Ćetković Helena, Perina Dragutin, Harcet Matija, Mikoč Andreja és Herak Bosnar Maja (2015): **Nme family of proteins--clues from simple animals..** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 388, 2:. 133–42. ISSN: 1432-1912

Chaffer C. L., és Weinberg R. A. (2011): **A Perspective on Cancer Cell Metastasis.** *Science.* 331, 6024:. 1559–1564. ISSN: 0036-8075

Chambers Ann F., Groom Alan C. és MacDonald Ian C. (2002): **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites..** *Nature reviews. Cancer.* 2, 8:. 563–72. ISSN: 1474-175X

Chang C. L., Zhu X. X., Thoraval D. H., Ungar D., Rawwas J., Hora N., Strahler J. R., Hanash S. M. és Radany E. (1994): **Nm23-H1 mutation in neuroblastoma..** *Nature.* 370, 6488:. 335–6. ISSN: 0028-0836

Chen Wei, Xiong Sheng, Li Jin, Li Xiuying, Liu Yuan, Zou Chunbin és Mallampalli Rama K. (2015): **The ubiquitin E3 ligase SCF-FBXO24 recognizes deacetylated nucleoside diphosphate kinase A to enhance its degradation..** *Molecular and cellular biology.* 35, 6:. 1001–13. ISSN: 1098-5549

Chowdhury Dipanjan, Beresford Paul J., Zhu Pengcheng, Zhang Dong, Sung Jung-Suk, Demple Bruce, Perrino Fred W. és Lieberman Judy (2006): **The Exonuclease TREX1 Is in the SET Complex and Acts in Concert with NM23-H1 to Degrade DNA during Granzyme A-Mediated Cell Death.** *Molecular Cell.* 23, 1:. 133–142. ISSN: 10972765

Cleland W. W. (1963): **The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations..** *Biochimica et biophysica acta.* 67. 104–37. ISSN: 0006-3002

Cocucci Emanuele, Racchetti Gabriella és Meldolesi Jacopo (2009): **Shedding microvesicles: artefacts no more..** *Trends in cell biology.* 19, 2:. 43–51. ISSN: 1879-3088

Conery Andrew R., Sever Sanja és Harlow Ed (2010): **Nucleoside diphosphate kinase Nm23-H1 regulates chromosomal stability by activating the GTPase dynamin during**

cytokinesis.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 35:. 15461–6. ISSN: 1091-6490

Conradt Barbara, Wu Yi-Chun és Xue Ding (2016a): **Programmed Cell Death During Caenorhabditis elegans Development..** *Genetics*. 203, 4:. 1533–62. ISSN: 1943-2631

Conradt Barbara, Wu Yi-Chun és Xue Ding (2016b): **Programmed Cell Death During Caenorhabditis elegans Development..** *Genetics*. 203, 4:. 1533–62. ISSN: 1943-2631

Cowling Belinda S., Toussaint Anne, Muller Jean és Laporte Jocelyn (2012): **Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: insights from animal models..** *PLoS genetics*. 8, 4:. e1002595. ISSN: 1553-7404

Cram Erin J., Shang Hongyu és Schwarzbauer Jean E. (2006): **A systematic RNA interference screen reveals a cell migration gene network in C. elegans..** *Journal of cell science*. 119, Pt 23: 4811–8. ISSN: 0021-9533

D’Angelo Anna, Garzia Livia, André Alessandra, Carotenuto Pietro, Aglio Veruska, Guardiola Ombretta, Arrigoni Gianluigi, Cossu Antonio, Palmieri Giuseppe, Aravind L. és Zollo Massimo (2004): **Prune cAMP phosphodiesterase binds nm23-H1 and promotes cancer metastasis..** *Cancer cell*. 5, 2:. 137–49. ISSN: 1535-6108

Dammai V., Adryan Boris, Lavenburg Kim R. és Hsu Tien (2003): **Drosophila awd, the homolog of human nm23, regulates FGF receptor levels and functions synergistically with shi/dynamin during tracheal development.** *Genes & Development*. 17, 22:. 2812–2824. ISSN: 0890-9369

Dammai Vincent, Adryan Boris, Lavenburg Kim R. és Hsu Tien (2003a): **Drosophila awd, the homolog of human nm23, regulates FGF receptor levels and functions synergistically with shi/dynamin during tracheal development..** *Genes & development*. 17, 22:. 2812–24. ISSN: 0890-9369

Dammai Vincent, Adryan Boris, Lavenburg Kim R. és Hsu Tien (2003b): **nm23 , regulates FGF receptor levels and functions synergistically with shi / dynamin during tracheal development.** *Genes & Development*. 2812–2824. ISSN: 0890-9369 (Print)

de Cárcer Guillermo (2019): **The Mitotic Cancer Target Polo-Like Kinase 1: Oncogene or Tumor Suppressor?.** *Genes*. 10, 3:. ISSN: 2073-4425

DeSantis Carol E., Lin Chun Chieh, Mariotto Angela B., Siegel Rebecca L., Stein Kevin D., Kramer Joan L., Alteri Rick, Robbins Anthony S. és Jemal Ahmedin (2014): **Cancer treatment and survivorship statistics, 2014..** *CA: a cancer journal for clinicians*. 64, 4:. 252–71. ISSN: 1542-4863

Desvignes Thomas, Pontarotti Pierre, Fauvel Christian és Bobe Julien (2009): **Nme protein**

family evolutionary history, a vertebrate perspective.. *BMC evolutionary biology*. 9, 1: 256. ISSN: 1471-2148

Detchokul S., Williams E. D., Parker M. W. és Frauman A. G. (2014): **Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies.** *British Journal of Pharmacology*. 171, 24: 5462–5490. ISSN: 00071188

Dong J. T., Suzuki H., Pin S. S., Bova G. S., Schalken J. A., Isaacs W. B., Barrett J. C. és Isaacs J. T. (1996): **Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss..** *Cancer research*. 56, 19: 4387–90. ISSN: 0008-5472

Duchek P., Somogyi K., Jékely G., Beccari S. és Rørth P. (2001): **Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor..** *Cell*. 107, 1: 17–26. ISSN: 0092-8674

Dumas Audrey, Lê-Bury Gabrielle, Marie-Anaïs Florence, Herit Floriane, Mazzolini Julie, Guilbert Thomas, Bourdoncle Pierre, Russell David G., Benichou Serge, Zahraoui Ahmed és Niedergang Florence (2015): **The HIV-1 protein Vpr impairs phagosome maturation by controlling microtubule-dependent trafficking..** *The Journal of cell biology*. 211, 2: 359–72. ISSN: 1540-8140

Durán Ma Carmen, Vega Francisco, Moreno-Bueno Gema, Artiga Ma Jesus, Sanchez Lydia, Palacios Jose, Ridley Anne és Timms John F. (2008): **Characterisation of tumoral markers correlated with ErbB2 (HER2/Neu) overexpression and metastasis in breast cancer.** *PROTEOMICS - CLINICAL APPLICATIONS*. 2, 9: 1313–1326. ISSN: 18628346

Ellis H. M., és Horvitz H. R. (1986): **Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans..** *Cell*. 44, 6: 817–29. ISSN: 0092-8674

Fadool J. M., Hartl D. L. és Dowling J. E. (1998): **Transposition of the mariner element from Drosophila mauritiana in zebrafish..** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 9: 5182–6. ISSN: 0027-8424

Fan Zusen, Beresford Paul J., Oh David Y., Zhang Dong és Lieberman Judy (2003): **Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor..** *Cell*. 112, 5: 659–72. ISSN: 0092-8674

Fancsalszky Luca, Monostori Eszter, Farkas Zsolt, Pourkarimi Ehsan, Masoudi Neda, Hargitai Balázs, Bosnar Maja Herak, Deželjin Martina, Zsákai Annamária, Vellai Tibor, Mehta Anil és Takács-Vellai Krisztina (2014): **NDK-1, the homolog of NM23-H1/H2 regulates cell migration and apoptotic engulfment in C. elegans..** *PloS one*. 9, 3: e92687.

ISSN: 1932-6203

Faraji Farhoud, Pang Yanli, Walker Renard C., Nieves Borges Rosan, Yang Li és Hunter Kent W. (2012): **Cadm1 is a metastasis susceptibility gene that suppresses metastasis by modifying tumor interaction with the cell-mediated immunity..** *PLoS genetics*. 8, 9:.. e1002926. ISSN: 1553-7404

Farkas Zsolt (2011): *A nukleozid-difoszfát kinázt kódoló Y48G8AL.15 gén genetikai analízise C. elegansban.*

Farkas Zsolt, Fancsalszky Luca, Saskoi Éva, Gráf Alexandra, Tárnok Krisztián, Mehta Anil és Takács-Vellai Krisztina (2018): **The dosage-dependent effect exerted by the NM23-H1/H2 homolog NDK-1 on distal tip cell migration in C. elegans.** *Laboratory Investigation*. 98, 2:.. 182–189. ISSN: 15300307

Farkas Zsolt, Petric Metka, Liu Xianghua, Herit Floriane, Rajnavölgyi Éva, Szondy Zsuzsa, Budai Zsófia, Orbán Tamás I., Sándor Sára, Mehta Anil, Bajtay Zsuzsa, Kovács Tibor, Jung Sung Yun, Shakir Muhammed Afaq, Qin Jun, Zhou Zheng, Niedergang Florence, Boissan Mathieu és Takács-Vellai Krisztina (2019a): **The nucleoside diphosphate kinase NDK-1/NME1 promotes phagocytosis in concert with DYN-1/dynamin.** *The FASEB Journal*. , 1:.. fj.201900220R. ISSN: 0892-6638

Farkas Zsolt, Petric Metka, Liu Xianghua, Herit Floriane, Rajnavölgyi Éva, Szondy Zsuzsa, Budai Zsófia, Orbán Tamás I., Sándor Sára, Mehta Anil, Bajtay Zsuzsa, Kovács Tibor, Jung Sung Yun, Shakir Muhammed Afaq, Qin Jun, Zhou Zheng, Niedergang Florence, Boissan Mathieu és Takács-Vellai Krisztina (2019b): **The nucleoside diphosphate kinase NDK-1/NME1 promotes phagocytosis in concert with DYN-1/Dynamin..** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. fj201900220R. ISSN: 1530-6860

Ferguson Shawn, Raimondi Andrea, Paradise Summer, Shen Hongying, Mesaki Kumi, Ferguson Agnes, Destaing Olivier, Ko Genevieve, Takasaki Junko, Cremona Ottavio, O’Toole Eileen, De Camilli Pietro és De Camilli Pietro (2009): **Coordinated Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits.** *Developmental Cell*. 17, 6:.. 811–822. ISSN: 15345807

Fiore L. S., Ganguly S. S., Sledziona J., Cibull M. L., Wang C., Richards D. L., Neltner J. M., Beach C., McCorkle J. R., Kaetzel D. M. és Plattner R. (2014): **c-Abl and Arg induce cathepsin-mediated lysosomal degradation of the NM23-H1 metastasis suppressor in invasive cancer.** *Oncogene*. 33, 36:.. 4508–4520. ISSN: 0950-9232

Fritz G. (2009): **Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy..**

Current cancer drug targets. 9, 5.: 626–38. ISSN: 1873-5576

Fujimoto Y., Ohtake T., Nishimori H., Ikuta K., Ohhira M., Ono M. és Kohgo Y. (1998): **Reduced expression and rare genomic alteration of nm23-H1 in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines..** *Journal of gastroenterology.* 33, 3.: 368–75. ISSN: 0944-1174

Gardai Shyra J., Bratton Donna L., Ogden Carole Anne és Henson Peter M. (2006): **Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective..** *Journal of leukocyte biology.* 79, 5.: 896–903. ISSN: 0741-5400

Gartner Anton, Boag Peter R. és Blackwell T. Keith (2008): **Germline survival and apoptosis..** *WormBook : the online review of C. elegans biology.* 1–20. ISSN: 1551-8507

Gold E. S., Underhill D. M., Morrisette N. S., Guo J., McNiven M. A. és Aderem A. (1999): **Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages..** *The Journal of experimental medicine.* 190, 12.: 1849–56. ISSN: 0022-1007

González-Pérez Vanessa, Reiner David J., Alan Jamie K., Mitchell Cicely, Edwards Lloyd J., Khazak Vladimir, Der Channing J. és Cox Adrienne D. (2010): **Genetic and functional characterization of putative Ras/Raf interaction inhibitors in C. elegans and mammalian cells..** *Journal of molecular signaling.* 5. 2. ISSN: 1750-2187

Griparic Lorena, van der Wel Nicole N., Orozco Ian J., Peters Peter J. és van der Blik Alexander M. (2004): **Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria.** *Journal of Biological Chemistry.* 279, 18.: 18792–18798. ISSN: 0021-9258

Guo P., Hu T., Zhang J., Jiang S. és Wang X. (2010): **Sequential action of Caenorhabditis elegans Rab GTPases regulates phagolysosome formation during apoptotic cell degradation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107, 42.: 18016–18021. ISSN: 0027-8424

Hanahan Douglas, és Weinberg Robert A. (2011a): **Hallmarks of cancer: the next generation..** *Cell.* 144, 5.: 646–74. ISSN: 1097-4172

Hanahan Douglas, és Weinberg Robert A. (2011b): **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell.* 144, 5.: 646–674. ISSN: 00928674

Hartsough, Clare S. E., Mair M., Elkahloun A. G., Sgroi D., Osborne C. K., Clark G. és Steeg P. S. (2001): **Elevation of breast carcinoma Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression and reduced motility by DNA methylation inhibition..** *Cancer research.* 61, 5.: 2320–7. ISSN: 0008-5472

Hartsough Melanie T., Morrison Deborah K., Salerno Massimiliano, Palmieri Diane, Ouatas

Taoufik, Mair Michael, Patrick Gilma és Steeg Patricia S. (2002): **Nm23-H1 Metastasis Suppressor Phosphorylation of Kinase Suppressor of Ras via a Histidine Protein Kinase Pathway.** *Journal of Biological Chemistry*. 277, 35.: 32389–32399. ISSN: 0021-9258

He Bin, Yu Xiaomeng, Margolis Moran, Liu Xianghua, Leng Xiaohong, Etzion Yael, Zheng Fei, Lu Nan, Quirocho Florante A., Danino Dganit és Zhou Zheng (2010): **Live-cell imaging in *Caenorhabditis elegans* reveals the distinct roles of dynamin self-assembly and guanosine triphosphate hydrolysis in the removal of apoptotic cells.** *Molecular biology of the cell*. 21, 4.: 610–29. ISSN: 1939-4586

Henne William M., Buchkovich Nicholas J. és Emr Scott D. (2011): **The ESCRT pathway.** *Developmental cell*. 21, 1.: 77–91. ISSN: 1878-1551

Hickson Jonathan A., Huo Dezheng, Vander Griend Donald J., Lin Anning, Rinker-Schaeffer Carrie W. és Yamada S. Diane (2006): **The p38 Kinases MKK4 and MKK6 Suppress Metastatic Colonization in Human Ovarian Carcinoma.** *Cancer Research*. 66, 4.: 2264–2270. ISSN: 0008-5472

Horak C. E., Mendoza A., Vega-Valle E., Albaugh M., Graff-Cherry C., McDermott W. G., Hua E., Merino M. J., Steinberg S. M., Khanna C. és Steeg P. S. (2007): **Nm23-H1 Suppresses Metastasis by Inhibiting Expression of the Lysophosphatidic Acid Receptor EDG2.** *Cancer Research*. 67, 24.: 11751–11759. ISSN: 0008-5472

Horak Christine E, Lee Jong Heun, Marshall Jean-Claude, Shreeve S. Martin és Steeg Patricia S. (2008): **The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy.** *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 116, 7–8.: 586–601. ISSN: 0903-4641

Horvitz H. Robert (2004): **Nobel lecture. Worms, life and death.** *Bioscience reports*. 23, 5–6.: 239–303. ISSN: 0144-8463

Hsu Tien (2011): **NME genes in epithelial morphogenesis.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 384, 4–5.: 363–72. ISSN: 1432-1912

Hsu Tien, Adereth Yair, Kose Nurgun és Dammai Vincent (2006): **Endocytic Function of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Regulates Surface Localization of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 and Cell Motility.** *Journal of Biological Chemistry*. 281, 17.: 12069–12080. ISSN: 0021-9258

Hsu Tien, Steeg Patricia S., Zollo Massimo, Wieland Thomas és Steering Committee on Nme-related research and the organizers of the International Congresses of the NDP Kinase/Nm23/awd Gene Family (2015): **Progress on Nme (NDP kinase/Nm23/Awd) gene family-related functions derived from animal model systems: studies on development,**

cardiovascular disease, and cancer metastasis exemplified. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 388, 2.: 109–117. ISSN: 0028-1298

Hsu Tsung-Yuan, és Wu Yi-Chun (2010): **Engulfment of apoptotic cells in *C. elegans* is mediated by integrin alpha/SRC signaling.** *Current biology : CB*. 20, 6.: 477–86. ISSN: 1879-0445

Hunter K. W., Broman K. W., Voyer T. L., Lukes L., Cozma D., Debies M. T., Rouse J. és Welch D. R. (2001): **Predisposition to efficient mammary tumor metastatic progression is linked to the breast cancer metastasis suppressor gene *Brms1*.** *Cancer research*. 61, 24.: 8866–72. ISSN: 0008-5472

Hurst Douglas R., Edmonds Mick D., Scott Gary K., Benz Christopher C., Vaidya Kedar S. és Welch Danny R. (2009): **Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis.** *Cancer research*. 69, 4.: 1279–83. ISSN: 1538-7445

Hurwitz Michael E., Vanderzalm Pamela J., Bloom Laird, Goldman Julia, Garriga Gian és Horvitz H. Robert (2009): **Abl kinase inhibits the engulfment of apoptotic [corrected] cells in *Caenorhabditis elegans*.** *PLoS biology*. 7, 4.: e99. ISSN: 1545-7885

Ignesti Marilena, Barraco Marilena, Nallamothe Gouthami, Woolworth Julie A., Duchi Serena, Gargiulo Giuseppe, Cavaliere Valeria és Hsu Tien (2014): **Notch signaling during development requires the function of *awd*, the *Drosophila* homolog of human metastasis suppressor gene *Nm23*.** *BMC Biology*. 12, 1.: 12. ISSN: 1741-7007

Iizumi Megumi, Liu Wen, Pai Sudha K., Furuta Eiji és Watabe Kounosuke (2008): **Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy.** *Biochimica et biophysica acta*. 1786, 2.: 87–104. ISSN: 0006-3002

Iwashita Shinki, Fujii Makiko, Mukai Hideyuki, Ono Yoshitaka és Miyamoto Masaaki (2004): **Lbc proto-oncogene product binds to and could be negatively regulated by metastasis suppressor *nm23-H2*.** *Biochemical and biophysical research communications*. 320, 4.: 1063–8. ISSN: 0006-291X

Jin Yishi (1999): **Transformation.** In: Hope Ian A. (szerk.): *C elegans, a practical approach*. Oxford University Press. Oxford. 69–96.

Joffre Carine, Barrow Rachel, Ménard Ludovic, Calleja Véronique, Hart Ian R. és Kermorgant Stéphanie (2011): **A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis.** *Nature cell biology*. 13, 7.: 827–37. ISSN: 1476-4679

Joshi Pradeep M., Riddle Misty R., Djabrayan Nareg J. V és Rothman Joel H. (2010): ***Caenorhabditis elegans* as a model for stem cell biology.** *Developmental dynamics : an*

official publication of the American Association of Anatomists. 239, 5.: 1539–54. ISSN: 1097-0177

Jouret François, Bernard Alfred, Hermans Cédric, Dom Geneviève, Terryn Sara, Leal Teresinha, Lebecque Patrick, Cassiman Jean-Jacques, Scholte Bob J., de Jonge Hugo R., Courtoy Pierre J. és Devuyst Olivier (2007): **Cystic Fibrosis Is Associated with a Defect in Apical Receptor–Mediated Endocytosis in Mouse and Human Kidney.** *Journal of the American Society of Nephrology.* 18, 3.: 707–718. ISSN: 1046-6673

Kagan V. E., Jiang J., Huang Z., Tyurina Y. Y., Desbourdes C., Cottet-Rousselle C., Dar H. H., Verma M., Tyurin V. A., Kapralov A. A., Cheikhi A., Mao G., Stolz D., St. Croix C. M., Watkins S., Shen Z., Li Y., Greenberg M. L., Tokarska-Schlattner M., Boissan M., Lacombe M. L., Epand R. M., Chu C. T., Mallampalli R. K., Bayır H. és Schlattner U. (2016): **NDPK-D (NM23-H4)-mediated externalization of cardiolipin enables elimination of depolarized mitochondria by mitophagy.** *Cell Death & Differentiation.* 23, 7.: 1140–1151. ISSN: 1350-9047

Kauffman Eric C., Robinson Victoria L., Stadler Walter M., Sokoloff Mitchell H. és Rinker-Schaeffer Carrie W. (2003): **Metastasis suppression: the evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site..** *The Journal of urology.* 169, 3.: 1122–33. ISSN: 0022-5347

Kawauchi Takeshi (2012): **Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis..** *International journal of molecular sciences.* 13, 4.: 4564–90. ISSN: 1422-0067

Kerr J. F., Wyllie A. H. és Currie A. R. (1972): **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics..** *British journal of cancer.* 26, 4.: 239–57. ISSN: 0007-0920

Khan Imran, Gril Brunilde és Steeg Patricia S. (2019): **Metastasis Suppressors NME1 and NME2 Promote Dynamin 2 Oligomerization and Regulate Tumor Cell Endocytosis, Motility and Metastasis..** *Cancer research.* canres.0492.2019. ISSN: 1538-7445

Kim Woojin, Underwood Ryan S., Greenwald Iva és Shaye Daniel D. (2018): **OrthoList 2: A New Comparative Genomic Analysis of Human and Caenorhabditis elegans Genes..** *Genetics.* 210, 2.: 445–461. ISSN: 1943-2631

Kinchen Jason M., Cabello Juan, Klingele Doris, Wong Kelvin, Feichtinger Richard, Schnabel Heinke, Schnabel Ralf és Hengartner Michael O. (2005): **Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in C. elegans.** *Nature.* 434, 7029.: 93–99. ISSN: 0028-0836

Kinchen Jason M., Doukoumetzidis Kimon, Almendinger Johann, Stergiou Lilli, Tosello-Tramont Annie, Sifri Costi D., Hengartner Michael O. és Ravichandran Kodi S. (2008): **A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells..** *Nature cell biology*. 10, 5:. 556–66. ISSN: 1476-4679

Kinchen Jason M., és Ravichandran Kodi S. (2010): **Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells.** *Nature*. 464, 7289:. 778–782. ISSN: 0028-0836

Kirienko Natalia V, Mani Kumaran és Fay David S. (2010): **Cancer models in *Caenorhabditis elegans*..** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 239, 5:. 1413–48. ISSN: 1097-0177

Kitano Masahiro, Nakaya Michio, Nakamura Takeshi, Nagata Shigekazu és Matsuda Michiyuki (2008): **Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation..** *Nature*. 453, 7192:. 241–5. ISSN: 1476-4687

Krishnan K. S., Rikhy R., Rao S., Shivalkar M., Mosko M., Narayanan R., Etter P., Estes P. S. és Ramaswami M. (2001): **Nucleoside diphosphate kinase, a source of GTP, is required for dynamin-dependent synaptic vesicle recycling..** *Neuron*. 30, 1:. 197–210. ISSN: 0896-6273

Kyriakakis Emmanouil, Markaki Maria és Tavernarakis Nektarios (2015): ***Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research..** *Molecular & cellular oncology*. 2, 2:. e975027. ISSN: 2372-3556

Lacombe Marie-Lise, Tokarska-Schlattner Malgorzata, Boissan Mathieu és Schlattner Uwe (2018): **The mitochondrial nucleoside diphosphate kinase (NDPK-D/NME4), a moonlighting protein for cell homeostasis..** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 98, 5:. 582–588. ISSN: 1530-0307

Lafourcade Céline, Sobo Komla, Kieffer-Jaquinod Sylvie, Garin Jérôme és van der Goot F. Gisou (2008): **Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization..** *PloS one*. 3, 7:. e2758. ISSN: 1932-6203

Lascu I., és Gonin P. (2000): **The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases..** *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 32, 3:. 237–46. ISSN: 0145-479X

Le Borgne Roland, Bardin Allison és Schweisguth François (2005): **The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling..** *Development (Cambridge, England)*. 132, 8:. 1751–62. ISSN: 0950-1991

Lee Jae-Jin, Kim Hwang Suk, Lee Ji-Sun, Park Jimin, Shin Sang Chul, Song Soonwha, Lee

Eunsun, Choi Jung-Eun, Suh Ji-Wan, Lee Hongsoo, Kim Eunice EunKyeong, Seo Eun Kyoung, Shin Dong Hae, Lee Ho-Young, Lee Hee-Yoon és Lee Kong-Joo (2018): **Small molecule activator of Nm23/NDPK as an inhibitor of metastasis..** *Scientific reports*. 8, 1.: 10909. ISSN: 2045-2322

Lehmann R. (2001): **Cell migration in invertebrates: clues from border and distal tip cells..** *Current opinion in genetics & development*. 11, 4.: 457–63. ISSN: 0959-437X

Leone A., Flatow U., King C. R., Sandeen M. A., Margulies I. M., Liotta L. A. és Steeg P. S. (1991): **Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells..** *Cell*. 65, 1.: 25–35. ISSN: 0092-8674

Li W., Zou W., Zhao D., Yan J., Zhu Z., Lu J. és Wang X. (2009): **C. elegans Rab GTPase activating protein TBC-2 promotes cell corpse degradation by regulating the small GTPase RAB-5.** *Development*. 136, 14.: 2445–2455. ISSN: 0950-1991

Li Yuanjun, Tong Yao és Wong Yung H. (2015): **Regulatory functions of Nm23-H2 in tumorigenesis: insights from biochemical to clinical perspectives..** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 388, 2.: 243–56. ISSN: 1432-1912

Li Zao, Lu Nan, He Xiangwei és Zhou Zheng (2013): **Monitoring the clearance of apoptotic and necrotic cells in the nematode Caenorhabditis elegans..** *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 1004. 183–202. ISSN: 1940-6029

Lilly A. Joshua, Khanim Farhat L. és Bunce Christopher M. (2015): **The case for extracellular Nm23-H1 as a driver of acute myeloid leukaemia (AML) progression..** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 388, 2.: 225–33. ISSN: 1432-1912

Lim J., és Thiery J. P. (2012): **Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development.** *Development*. 139, 19.: 3471–3486. ISSN: 0950-1991

Liu Wen, Vivian Carolyn J., Brinker Amanda E., Hampton Kelsey R., Lianidou Evi és Welch Danny R. (2014): **Microenvironmental Influences on Metastasis Suppressor Expression and Function during a Metastatic Cell's Journey..** *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 7, 3.: 117–31. ISSN: 1875-2292

Liu Ying, Samuel Buck S., Breen Peter C. és Ruvkun Gary (2014): **Caenorhabditis elegans pathways that surveil and defend mitochondria..** *Nature*. 508, 7496.: 406–10. ISSN: 1476-4687

Lotan Tamara, Hickson Jonathan, Souris Jeffrey, Huo Dezheng, Taylor Jennifer, Li Terry, Otto Kristen, Yamada Seiko Diane, Macleod Kay és Rinker-Schaeffer Carrie W. (2008): **c-Jun NH2-terminal kinase activating kinase 1/mitogen-activated protein kinase kinase 4-**

mediated inhibition of SKOV3ip.1 ovarian cancer metastasis involves growth arrest and p21 up-regulation.. *Cancer research*. 68, 7:. 2166–75. ISSN: 1538-7445

Lu Han, és Bilder David (2005): **Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in Drosophila..** *Nature cell biology*. 7, 12:. 1232–9. ISSN: 1465-7392

Lu Nan, és Zhou Zheng (2012): **Membrane trafficking and phagosome maturation during the clearance of apoptotic cells..** *International review of cell and molecular biology*. 293. 269–309. ISSN: 1937-6448

Luzzi K. J., MacDonald I. C., Schmidt E. E., Kerkvliet N., Morris V. L., Chambers A. F. és Groom A. C. (1998): **Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases..** *The American journal of pathology*. 153, 3:. 865–73. ISSN: 0002-9440

Ma Deqin, McCorkle Joseph R. és Kaetzel David M. (2004): **The metastasis suppressor NM23-H1 possesses 3'-5' exonuclease activity..** *The Journal of biological chemistry*. 279, 17:. 18073–84. ISSN: 0021-9258

Ma Wei, Chen Jun, Xue Xingyang, Wang Zhuomin, Liu Hongyu, Wang Ting, Bai Yun, Tang Shou-Ching és Zhou Qinghua (2008): **Alteration in gene expression profile and biological behavior in human lung cancer cell line NL9980 by nm23-H1 gene silencing.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371, 3:. 425–430. ISSN: 0006291X

Mangahas Paolo M., és Zhou Zheng (2005): **Clearance of apoptotic cells in Caenorhabditis elegans..** *Seminars in cell & developmental biology*. 16, 2:. 295–306. ISSN: 1084-9521

Marie-Anaïs Florence, Mazzolini Julie, Herit Floriane és Niedergang Florence (2016): **Dynamin-Actin Cross Talk Contributes to Phagosome Formation and Closure..** *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 17, 5:. 487–99. ISSN: 1600-0854

Marino N., Marshall J. C., Collins J. W., Zhou M., Qian Y., Veenstra T. és Steeg P. S. (2013): **Nm23-H1 Binds to Gelsolin and Inactivates Its Actin-Severing Capacity to Promote Tumor Cell Motility and Metastasis.** *Cancer Research*. 73, 19:. 5949–5962. ISSN: 0008-5472

Marino Natascia, Nakayama Joji, Collins Joshua W. és Steeg Patricia S. (2012): **Insights into the biology and prevention of tumor metastasis provided by the Nm23 metastasis suppressor gene.** *Cancer and Metastasis Reviews*. 31, 3–4:. 593–603. ISSN: 0167-7659

Marion Sabrina, Mazzolini Julie, Herit Floriane, Bourdoncle Pierre, Kambou-Pene Nadège, Hailfinger Stephan, Sachse Martin, Ruland Jürgen, Benmerah Alexandre, Echard Arnaud, Thome Margot és Niedergang Florence (2012): **The NF-κB signaling protein Bcl10**

regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles.. *Developmental cell*. 23, 5:. 954–67. ISSN: 1878-1551

Martinez Jennifer, Almendinger Johann, Oberst Andrew, Ness Rachel, Dillon Christopher P., Fitzgerald Patrick, Hengartner Michael O. és Green Douglas R. (2011): **Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells..** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 42:. 17396–401. ISSN: 1091-6490

Masoudi Neda, Fancsalszky Luca, Pourkarimi Ehsan, Vellai Tibor, Alexa Anita, Reményi Attila, Gartner Anton, Mehta Anil és Takács-Vellai Krisztina (2013): **The NM23-H1/H2 homolog NDK-1 is required for full activation of Ras signaling in C. elegans..** *Development (Cambridge, England)*. 140, 16:. 3486–95. ISSN: 1477-9129

Maxfield Frederick R. (2014): **Role of endosomes and lysosomes in human disease..** *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6, 5:. a016931. ISSN: 1943-0264

Mazzolini Julie, Herit Floriane, Bouchet Jérôme, Benmerah Alexandre, Benichou Serge és Niedergang Florence (2010): **Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments..** *Blood*. 115, 21:. 4226–36. ISSN: 1528-0020

McCaffrey Luke Martin, és Macara Ian G. (2011): **Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis.** *Trends in Cell Biology*. 21, 12:. 727–735. ISSN: 09628924

McDonald Jocelyn A., Pinheiro Elaine M. és Montell Denise J. (2003): **PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman..** *Development (Cambridge, England)*. 130, 15:. 3469–78. ISSN: 0950-1991

McKim K. S., Peters K. és Rose A. M. (1993): **Two types of sites required for meiotic chromosome pairing in Caenorhabditis elegans..** *Genetics*. 134, 3:. 749–68. ISSN: 0016-6731

Mellman Ira, és Yarden Yosef (2013): **Endocytosis and cancer..** *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5, 12:. a016949. ISSN: 1943-0264

Mello C., és Fire A. (1995): **DNA transformation..** *Methods in cell biology*. 48. 451–82. ISSN: 0091-679X

Miaczynska Marta, Pelkmans Lucas és Zerial Marino (2004): **Not just a sink: endosomes in control of signal transduction..** *Current opinion in cell biology*. 16, 4:. 400–6. ISSN: 0955-0674

Miller Kathy D., Althouse Sandra K., Nabell Lisle, Rugo Hope, Carey Lisa, Kimmick Gretchen, Jones David R., Merino Maria J. és Steeg Patricia S. (2014): **A phase II study of**

medroxyprogesterone acetate in patients with hormone receptor negative metastatic breast cancer: translational breast cancer research consortium trial 007.. *Breast cancer research and treatment*. 148, 1: 99–106. ISSN: 1573-7217

Miyamoto Masaaki, Iwashita Shinki, Yamaguchi Satomi és Ono Yoshitaka (2009): **Role of nm23 in the regulation of cell shape and migration via Rho family GTPase signals..** *Molecular and cellular biochemistry*. 329, 1–2: 175–9. ISSN: 1573-4919

Mocan Iulia, Georgescauld Florian, Gonin Philippe, Thoraval Didier, Cervoni Laura, Giartosio Anna, Dabernat-Arnaud Sandrine, Crouzet Marc, Lacombe Marie-Lise és Lascu Ioan (2007): **Protein phosphorylation corrects the folding defect of the neuroblastoma (S120G) mutant of human nucleoside diphosphate kinase A/Nm23-H1..** *The Biochemical journal*. 403, 1: 149–56. ISSN: 1470-8728

Montell Denise J., Yoon Wan Hee és Starz-Gaiano Michelle (2012): **Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells..** *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13, 10: 631–45. ISSN: 1471-0080

Moreno V., Gonzalo P., Gomez-Escudero J., Pollan A., Acin-Perez R., Breckenridge M., Yanez-Mo M., Barreiro O., Orsenigo F., Kadomatsu K., Chen C. S., Enriquez J. A., Dejana E., Sanchez-Madrid F. és Arroyo A. G. (2014): **An EMMPRIN- -catenin-Nm23 complex drives ATP production and actomyosin contractility at endothelial junctions.** *Journal of Cell Science*. 127, 17: 3768–3781. ISSN: 0021-9533

Morioka Sho, Perry Justin S. A., Raymond Michael H., Medina Christopher B., Zhu Yunlu, Zhao Liyang, Serbulea Vlad, Onengut-Gumuscu Suna, Leitinger Norbert, Kucenas Sarah, Rathmell Jeffrey C., Makowski Liza és Ravichandran Kodi S. (2018): **Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release..** *Nature*. 563, 7733: 714–718. ISSN: 1476-4687

Muimo Richmond, Alotheid Hani Mm és Mehta Anil (2018): **NM23 proteins: innocent bystanders or local energy boosters for CFTR?.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 98, 3: 272–282. ISSN: 1530-0307

Murakami Masanao, Kaul Rajeev, Kumar Pankaj és Robertson Erle S. (2009): **Nucleoside diphosphate kinase/Nm23 and Epstein–Barr virus.** *Molecular and Cellular Biochemistry*. 329, 1–2: 131–139. ISSN: 0300-8177

Murakami Masanao, Meneses Patricio I., Knight Jason S., Lan Ke, Kaul Rajeev, Verma Subhash C. és Robertson Erle S. (2008): **Nm23-H1 modulates the activity of the guanine exchange factor Dbl-1..** *International journal of cancer*. 123, 3: 500–10. ISSN: 1097-0215

Muthuswamy Senthil K., és Xue Bin (2012): **Cell Polarity as a Regulator of Cancer Cell**

Behavior Plasticity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 28, 1.: 599–625.

ISSN: 1081-0706

Nagrath Sunitha, Sequist Lecia V, Maheswaran Shyamala, Bell Daphne W., Irimia Daniel, Ulkus Lindsey, Smith Matthew R., Kwak Eunice L., Digumarthy Subba, Muzikansky Alona, Ryan Paula, Balis Ulysses J., Tompkins Ronald G., Haber Daniel A. és Toner Mehmet (2007): **Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.** *Nature.* 450, 7173.: 1235–9. ISSN: 1476-4687

Nagy László, Bálint Bálint László, Meskó Bertalan, Lányi Árpád, Scholtz Beáta, Széles Lajos és Varga Tamás (2011): **Molekuláris Medicina Alapjai.** Elérés forrás
https://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_medicina_hu_book/adatok.html

Nallamothu Gouthami, Woolworth Julie A., Dammai Vincent és Hsu Tien (2008): **Awd, the homolog of metastasis suppressor gene Nm23, regulates Drosophila epithelial cell invasion.** *Molecular and cellular biology.* 28, 6.: 1964–73. ISSN: 1098-5549

Niitsu N. (2001): **[Serum levels of mm23-H1 protein and their clinical implications in malignant lymphoma].** *[Rinsho ketsueki] The Japanese journal of clinical hematology.* 42, 12.: 1155–61. ISSN: 0485-1439

Niitsu N., Okabe-Kado J., Nakayama M., Wakimoto N., Sakashita A., Maseki N., Motoyoshi K., Umeda M. és Honma Y. (2000): **Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implications in acute myelogenous leukemia.** *Blood.* 96, 3.: 1080–6. ISSN: 0006-4971

Nikolopoulos Sotiris N., és Giancotti Filippo G. (2005): **Netrin-integrin signaling in epithelial morphogenesis, axon guidance and vascular patterning.** *Cell cycle (Georgetown, Tex.).* 4, 3.: e131-5. ISSN: 1551-4005

Nishiwaki K. (1999): **Mutations affecting symmetrical migration of distal tip cells in Caenorhabditis elegans.** *Genetics.* 152, 3.: 985–97. ISSN: 0016-6731

Ohkumo Tsuyoshi, Masutani Chikahide, Eki Toshihiko és Hanaoka Fumio (2008): **Use of RNAi in C. elegans.** *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* 442. 129–37. ISSN: 1064-3745

Okabe-Kado J., Kasukabe T., Honma Y., Hayashi M., Henzel W. J. és Hozumi M. (1992): **Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with NM23/nucleoside diphosphate kinase.** *Biochemical and biophysical research communications.* 182, 3.: 987–94. ISSN: 0006-291X

Orimo Akira, és Weinberg Robert A. (2007): **Heterogeneity of stromal fibroblasts in**

tumors.. *Cancer biology & therapy*. 6, 4:. 618–9. ISSN: 1538-4047

Orr F. W., és Wang H. H. (2001): **Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis..** *Surgical oncology clinics of North America*. 10, 2:. 357–81, ix–x. ISSN: 1055-3207

Pal Sharmistha, Vishwanath Sheethal N., Erdjument-Bromage Hediye, Tempst Paul és Sif Saïd (2004): **Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes..** *Molecular and cellular biology*. 24, 21:. 9630–45. ISSN: 0270-7306

Palacios Felipe, Schweitzer Jill K., Boshans Rita L. és D'Souza-Schorey Crislyn (2002): **ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly.** *Nature Cell Biology*. 4, 12:. 929–936. ISSN: 1465-7392

Palmieri Diane, Halverson Douglas O., Ouatas Taoufik, Horak Christine E., Salerno Massimiliano, Johnson Jennifer, Figg W. Douglas, Hollingshead Melinda, Hursting Stephen, Berrigan David, Steinberg Seth M., Merino Maria J. és Steeg Patricia S. (2005): **Medroxyprogesterone acetate elevation of Nm23-H1 metastasis suppressor expression in hormone receptor-negative breast cancer..** *Journal of the National Cancer Institute*. 97, 9:. 632–42. ISSN: 1460-2105

Palmieri Diane, Horak Christine E., Lee Jong-Heun, Halverson Douglas O. és Steeg Patricia S. (2006): **Translational approaches using metastasis suppressor genes.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 38, 3–4:. 151–161. ISSN: 0145-479X

Paredes Joana, Figueiredo Joana, Albergaria André, Oliveira Patrícia, Carvalho Joana, Ribeiro Ana Sofia, Caldeira Joana, Costa Ângela Margarida, Simões-Correia Joana, Oliveira Maria José, Pinheiro Hugo, Pinho Salomé S., Mateus Rita, Reis Celso A., Leite Marina, Fernandes Maria Sofia, Schmitt Fernando, Carneiro Fátima, Figueiredo Céu, Oliveira Carla és Seruca Raquel (2012): **Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1826, 2:. 297–311. ISSN: 0304419X

Park Yeong-Gwan, Zhao Xiaohong, Lesueur Fabienne, Lowy Douglas R., Lancaster Mindy, Pharoah Paul, Qian Xiaolan és Hunter Kent W. (2005): **Sipa1 is a candidate for underlying the metastasis efficiency modifier locus Mtes1..** *Nature genetics*. 37, 10:. 1055–62. ISSN: 1061-4036

Peters Eldon C., Gossett Andrea J., Goldstein Bob, Der Channing J. és Reiner David J. (2013): **Redundant canonical and noncanonical *Caenorhabditis elegans* p21-activated kinase signaling governs distal tip cell migrations..** *G3 (Bethesda, Md.)*. 3, 2:. 181–95.

ISSN: 2160-1836

Pinon Véronique Phung-Ba, Millot Guy, Munier Annie, Vassy Jany, Linares-Cruz Gustavo, Capeau Jacqueline, Calvo Fabien és Lacombe Marie-Lise (1999): **Cytoskeletal Association of the A and B Nucleoside Diphosphate Kinases of Interphasic But Not Mitotic Human Carcinoma Cell Lines: Specific Nuclear Localization of the B Subunit.** *Experimental Cell Research*. 246, 2:. 355–367. ISSN: 00144827

Plaitakis Andreas, Kalef-Ezra Ester, Kotzamani Dimitra, Zaganas Ioannis és Spanaki Cleanthe (2017): **The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease..** *Biology*. 6, 1:. 11. ISSN: 2079-7737

Puts Gemma S., Leonard M. Kathryn, Pamidimukkala Nidhi V, Snyder Devin E. és Kaetzel David M. (2018): **Nuclear functions of NME proteins..** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 98, 2:. 211–218. ISSN: 1530-0307

Reddien P W, és Horvitz H. R. (2000): **CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in Caenorhabditis elegans..** *Nature cell biology*. 2, 3:. 131–6. ISSN: 1465-7392

Reddien Peter W, és Horvitz H. Robert (2004): **The engulfment process of programmed cell death in caenorhabditis elegans..** *Annual review of cell and developmental biology*. 20. 193–221. ISSN: 1081-0706

Reymond Alexandre, Volorio Sara, Merla Giuseppe, Al-Maghtheh Mai, Zuffardi Orsetta, Bulfone Alessandro, Ballabio Andrea és Zollo Massimo (1999): **Evidence for interaction between human PRUNE and nm23-H1 NDPKinase.** *Oncogene*. 18, 51:. 7244–7252. ISSN: 0950-9232

Riddle Donald L., és Albert Patrice S. (1997): *Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development. C. elegans II. .* ISBN: 0879695323

Rieckher Matthias, és Tavernarakis Nektarios (2017): **Caenorhabditis elegans Microinjection..** *Bio-protocol*. 7, 19:. ISSN: 2331-8325

Rink Jochen, Ghigo Eric, Kalaidzidis Yannis és Zerial Marino (2005): **Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes..** *Cell*. 122, 5:. 735–49. ISSN: 0092-8674

Ritchie Hannah (2019): **Cancer death rates are falling; five-year survival rates are rising.** Elérés forrás <https://ourworldindata.org/cancer-death-rates-are-falling-five-year-survival-rates-are-rising>

Robinson Kelly A., Goyard Sophie és Beverley Stephen M. (2004): **In vitro shuttle mutagenesis using engineered mariner transposons..** *Methods in molecular biology*

(Clifton, N.J.). 270. 299–318. ISSN: 1064-3745

Rocheleau C. E., Yasuda J., Shin T. H., Lin R., Sawa H., Okano H., Priess J. R., Davis R. J. és Mello C. C. (1999): **WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce**

anterior/posterior polarity signals in C. elegans.. *Cell*. 97, 6.: 717–26. ISSN: 0092-8674

Rodriguez-Boulán Enrique, és Macara Ian G. (2014): **Organization and execution of the epithelial polarity programme..** *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15, 4.: 225–42.

ISSN: 1471-0080

Rosengard A. M., Krutzsch H. C., Shearn A., Biggs J. R., Barker E., Margulies I. M., King C. R., Liotta L. A. és Steeg P. S. (1989): **Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis**

and aberrant Drosophila development.. *Nature*. 342, 6246.: 177–80. ISSN: 0028-0836

Sasaki Ayaka, Nakae Isei, Nagasawa Maya, Hashimoto Keisuke, Abe Fumiko, Saito Kota, Fukuyama Masamitsu, Gengyo-Ando Keiko, Mitani Shohei, Katada Toshiaki és Kontani Kenji (2013): **Arl8/ARL-8 functions in apoptotic cell removal by mediating**

phagolysosome formation in Caenorhabditis elegans.. *Molecular biology of the cell*. 24, 10.: 1584–92. ISSN: 1939-4586

Schlattner Uwe, Tokarska-Schlattner Malgorzata, Ramirez Sacnicte, Tyurina Yulia Y.,

Amoscato Andrew A., Mohammadyani Dariush, Huang Zhentai, Jiang Jianfei, Yanamala

Naveena, Seffouh Amal, Boissan Mathieu, Epand Raquel F., Epand Richard M., Klein-

Seetharaman Judith, Lacombe Marie-Lise és Kagan Valerian E. (2013): **Dual Function of**

Mitochondrial Nm23-H4 Protein in Phosphotransfer and Intermembrane Lipid

Transfer. *Journal of Biological Chemistry*. 288, 1.: 111–121. ISSN: 0021-9258

Schmid Sandra L., és Frolov Vadim A. (2011): **Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst..** *Annual review of cell and developmental biology*. 27, 1.: 79–105. ISSN: 1530-8995

Scita Giorgio, és Di Fiore Pier Paolo (2010): **The endocytic matrix.** *Nature*. 463, 7280.: 464–473. ISSN: 0028-0836

Sendoel Ataman, Kohler Ines, Fellmann Christof, Lowe Scott W. és Hengartner Michael O. (2010): **HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal**

tyrosinase.. *Nature*. 465, 7298.: 577–83. ISSN: 1476-4687

Sever S., Damke H. és Schmid S. L. (2000): **Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis..** *The Journal of cell biology*. 150, 5.: 1137–48. ISSN: 0021-9525

Shakir M. Afaq, és Lundquist Erik A. (2005): **Analysis of Cell Migration in**

Caenorhabditis elegans.. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 294. 159–73. ISSN:

1064-3745

Shen Libing, Shi Qili és Wang Wenyuan (2018): **Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions..** *Oncogenesis*. 7, 3:. 25. ISSN: 2157-9024

Shevde Lalita A., és Welch Danny R. (2003): **Metastasis suppressor pathways--an evolving paradigm..** *Cancer letters*. 198, 1:. 1–20. ISSN: 0304-3835

Shpetner H. S., és Vallee R. B. (1989): **Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules..** *Cell*. 59, 3:. 421–32. ISSN: 0092-8674

Smelick Chris, és Ahmed Shawn (2005): **Achieving immortality in the C. elegans germline.** *Ageing Research Reviews*. 4, 1:. 67–82. ISSN: 15681637

Söderberg Ola, Gullberg Mats, Jarvius Malin, Ridderstråle Karin, Leuchowius Karl-Johan, Jarvius Jonas, Wester Kenneth, Hydbring Per, Bahram Fuad, Larsson Lars-Gunnar és Landegren Ulf (2006): **Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation..** *Nature methods*. 3, 12:. 995–1000. ISSN: 1548-7091

Spieth J., Brooke G., Kuersten S., Lea K. és Blumenthal T. (1993): **Operons in C. elegans: polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions..** *Cell*. 73, 3:. 521–32. ISSN: 0092-8674

Sporn M. B. (1996): **The war on cancer..** *Lancet (London, England)*. 347, 9012:. 1377–81. ISSN: 0140-6736

Stafford Lewis J., Vaidya Kedar S. és Welch Danny R. (2008): **Metastasis suppressors genes in cancer.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40, 5:. 874–891. ISSN: 13572725

Steeg, Bevilacqua G., Kopper L., Thorgeirsson U. P., Talmadge J. E., Liotta L. A. és Sobel M. E. (1988): **Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential..** *Journal of the National Cancer Institute*. 80, 3:. 200–4. ISSN: 0027-8874

Steeg Patricia S., Ouatas Taoufik, Halverson Douglas, Palmieri Diane és Salerno Massimiliano (2003): **Metastasis suppressor genes: basic biology and potential clinical use..** *Clinical breast cancer*. 4, 1:. 51–62. ISSN: 1526-8209

Steeg Patricia S., Palmieri Diane, Ouatas Taoufik és Salerno Massimiliano (2003): **Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer..** *Cancer letters*. 190, 1:. 1–12. ISSN: 0304-3835

Steeg Patricia S., Zollo Massimo és Wieland Thomas (2011): **A critical evaluation of biochemical activities reported for the nucleoside diphosphate kinase/Nm23/Awd family proteins: opportunities and missteps in understanding their biological functions..**

Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 384, 4–5.: 331–9. ISSN: 1432-1912

Stewart BW (2014): *World Cancer Report 2014*. . ISBN: 978-92-832-0443-5

Su Gloria H., Song Jason J., Repasky Elizabeth A., Schutte Mieke és Kern Scott E. (2002): **Mutation rate of MAP2K4/MKK4 in breast carcinoma..** *Human mutation*. 19, 1.: 81. ISSN: 1098-1004

Sulston J. E., és Horvitz H. R. (1977): **Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*..** *Developmental biology*. 56, 1.: 110–56. ISSN: 0012-1606

Sulston J. E., Schierenberg E., White J. G. és Thomson J. N. (1983): **The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*..** *Developmental biology*. 100, 1.: 64–119. ISSN: 0012-1606

Sun-Wada G. H., Tabata H., Kawamura N., Aoyama M. és Wada Y. (2009): **Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification.** *Journal of Cell Science*. 122, 14.: 2504–2513. ISSN: 0021-9533

Sun K. L. W., Correia J. P. és Kennedy T. E. (2011): **Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions.** *Development*. 138, 11.: 2153–2169. ISSN: 0950-1991

Takács-Vellai Krisztina, Vellai Tibor, Farkas Zsolt és Mehta Anil (2015): **Nucleoside diphosphate kinases (NDPKs) in animal development..** *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 72, 8.: 1447–62. ISSN: 1420-9071

Tee Yi-Torng, Chen Gin-Den, Lin Long-Yau, Ko Jiunn-Liang és Wang Po-Hui (2006): **Nm23-H1: a metastasis-associated gene..** *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. 45, 2.: 107–13. ISSN: 1875-6263

Teoh Shao Thing, és Lunt Sophia Y. (2018): **Metabolism in cancer metastasis: bioenergetics, biosynthesis, and beyond..** *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*. 10, 2.: ISSN: 1939-005X

Thakur Ram Krishna, Yadav Vinod Kumar, Kumar Akinchan, Singh Ankita, Pal Krishnendu, Hoepfner Luke, Saha Dhurjhoti, Purohit Gunjan, Basundra Richa, Kar Anirban, Halder Rashi, Kumar Pankaj, Baral Aradhita, Kumar MJ Mahesh, Baldi Alfonso, Vincenzi Bruno, Lorenzon Laura, Banerjee Rajkumar, Kumar Praveen, Shridhar Viji, Mukhopadhyay Debabrata és Chowdhury Shantanu (2014): **Non-metastatic 2 (NME2)-mediated suppression of lung cancer metastasis involves transcriptional regulation of key cell adhesion factor vinculin.** *Nucleic Acids Research*. 42, 18.: 11589–11600. ISSN: 1362-4962

Thakur Ram Krishna, Yadav Vinod Kumar, Kumar Pankaj és Chowdhury Shantanu (2011): **Mechanisms of non-metastatic 2 (NME2)-mediated control of metastasis across tumor types..** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 384, 4–5.: 397–406. ISSN: 1432-

Thiery Jean Paul, Acloque Hervé, Huang Ruby Y. J. és Nieto M. Angela (2009): **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease..** *Cell*. 139, 5.: 871–90. ISSN: 1097-4172

Tímár József (2004): **[Molecular mechanism of tumor progression. From Krompecher to the DNA microarray]..** *Magyar onkologia*. 48, 1.: 3–11. ISSN: 0025-0244

Tran Anh T., Chapman Eric M., Flamand Mathieu N., Yu Bin, Krempel Samuel J., Duchaine Thomas F., Eroglu Matthew és Derry W. Brent (2019): **MiR-35 buffers apoptosis thresholds in the C. elegans germline by antagonizing both MAPK and core apoptosis pathways.** *Cell Death and Differentiation*. . ISSN: 14765403

Traut T. W. (1994): **Physiological concentrations of purines and pyrimidines..** *Molecular and cellular biochemistry*. 140, 1.: 1–22. ISSN: 0300-8177

Vaccari Thomas, és Bilder David (2009): **At the crossroads of polarity, proliferation and apoptosis: the use of Drosophila to unravel the multifaceted role of endocytosis in tumor suppression..** *Molecular oncology*. 3, 4.: 354–65. ISSN: 1878-0261

Vaccari Thomas, Rusten Tor Erik, Menut Laurent, Nezis Ioannis P., Brech Andreas, Stenmark Harald és Bilder David (2009): **Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in Drosophila by efficient isolation of ESCRT mutants..** *Journal of cell science*. 122, Pt 14: 2413–23. ISSN: 0021-9533

Valastyan Scott, és Weinberg Robert A. (2011): **Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms..** *Cell*. 147, 2.: 275–92. ISSN: 1097-4172

Vander Griend Donald J., Kocherginsky Masha, Hickson Jonathan A., Stadler Walter M., Lin Anning és Rinker-Schaeffer Carrie W. (2005): **Suppression of Metastatic Colonization by the Context-Dependent Activation of the c-Jun NH₂-Terminal Kinase Kinases JNKK1/MKK4 and MKK7.** *Cancer Research*. 65, 23.: 10984–10991. ISSN: 0008-5472

Venegas Victor, és Zhou Zheng (2007): **Two alternative mechanisms that regulate the presentation of apoptotic cell engulfment signal in Caenorhabditis elegans..** (*D. Newmeyer, szerk.*) *Molecular biology of the cell*. 18, 8.: 3180–92. ISSN: 1059-1524

Verges Marcel (2007): **Retromer and sorting nexins in development..** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 12. 3825–51. ISSN: 1093-9946

Wakimoto N., Yokoyama A., Okabe-Kado J., Nagata N., Motoyoshi K. és Honma Y. (1998): **Combined analysis of differentiation inhibitory factor nm23-H1 and nm23-H2 as prognostic factors in acute myeloid leukaemia..** *British journal of cancer*. 77, 12.: 2298–303. ISSN: 0007-0920

- Wang S., és Kimble J. (2001): **The TRA-1 transcription factor binds TRA-2 to regulate sexual fates in *Caenorhabditis elegans*.** *The EMBO journal*. 20, 6.: 1363–72. ISSN: 0261-4189
- Wang X., Wu Yi-Chun, Fadok Valerie A., Lee Ming-Chia, Gengyo-Ando Keiko, Cheng Li-Chun, Ledwich Duncan, Hsu Pei-Ken, Chen Jia-Yun, Chou Bin-Kuan, Henson Peter, Mitani Shohei és Xue Ding (2003): **Cell Corpse Engulfment Mediated by *C. elegans* Phosphatidylserine Receptor Through CED-5 and CED-12.** *Science*. 302, 5650.: 1563–1566. ISSN: 0036-8075
- Wang Xiaochen, Li Weida, Zhao Dongfeng, Liu Bin, Shi Yong, Chen Baohui, Yang Hengwen, Guo Pengfei, Geng Xin, Shang Zhihong, Peden Erin, Kage-Nakadai Eriko, Mitani Shohei és Xue Ding (2010): ***Caenorhabditis elegans* transthyretin-like protein TTR-52 mediates recognition of apoptotic cells by the CED-1 phagocyte receptor.** *Nature cell biology*. 12, 7.: 655–64. ISSN: 1476-4679
- Ward J. O. (2001): **The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D3 receptor.** *Blood*. 98, 12.: 3290–3300. ISSN: 00064971
- Ward S., Thomson N., White J. G. és Brenner S. (1975): **Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *The Journal of comparative neurology*. 160, 3.: 313–37. ISSN: 0021-9967
- Warnock Dale E., és Schmid Sandra L. (1996): **Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch.** *BioEssays*. 18, 11.: 885–893. ISSN: 0265-9247
- Weber Georg F. (2016): **Metabolism in cancer metastasis.** *International journal of cancer*. 138, 9.: 2061–6. ISSN: 1097-0215
- Weinberg Robert (2007): **The Biology of Cancer.** *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 80, 2.: 91
- Weiss L. (2000): **Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s.** *Cancer metastasis reviews*. 19, 3–4.: I–XI, 193–383. ISSN: 0167-7659
- Welch Danny R. (2006): **Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions?** *Breast disease*. 26, 3–12. ISSN: 0888-6008
- Wong Ming-Ching, és Schwarzbauer Jean E. (2012): **Gonad morphogenesis and distal tip cell migration in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite.** *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*. 1, 4.: 519–31. ISSN: 1759-7692
- Woolworth Julie A., Nallamothu Gouthami és Hsu Tien (2009): **The *Drosophila* metastasis**

suppressor gene Nm23 homolog, awd, regulates epithelial integrity during oogenesis..

Molecular and cellular biology. 29, 17:. 4679–90. ISSN: 1098-5549

Wu Y. C., és Horvitz H. R. (1998): **C. elegans phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180..** *Nature.* 392, 6675:. 501–4. ISSN: 0028-0836

Wu Y. C., Tsai M. C., Cheng L. C., Chou C. J. és Weng N. Y. (2001): **C. elegans CED-12 acts in the conserved crkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment..** *Developmental cell.* 1, 4:. 491–502. ISSN: 1534-5807

Yan Jinchun, Yang Qin és Huang Qihong (2013): **Metastasis suppressor genes..** *Histology and histopathology.* 28, 3:. 285–92. ISSN: 1699-5848

Yang Fu, Huo Xi-song, Yuan Sheng-xian, Zhang Ling, Zhou Wei-ping, Wang Fang és Sun Shu-han (2013): **Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis..** *Molecular cell.* 49, 6:. 1083–96. ISSN: 1097-4164

Yu Xiaomeng, Lu Nan és Zhou Zheng (2008): **Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells..** (*K. L. Simons, szerk.*) *PLoS biology.* 6, 3:. e61. ISSN: 1545-7885

Yu Xiaomeng, Odera Sampeter, Chuang Chin-Hua, Lu Nan és Zhou Zheng (2006): **C. elegans Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells..** *Developmental cell.* 10, 6:. 743–57. ISSN: 1534-5807

Zala Diana, Schlattner Uwe, Desvignes Thomas, Bobe Julien, Roux Aurélien, Chavrier Philippe és Boissan Mathieu (2017): **The advantage of channeling nucleotides for very processive functions..** *Fl1000Research.* 6. 724. ISSN: 2046-1402

Zeiser Eva, Frøkjær-Jensen Christian, Jorgensen Erik és Ahringer Julie (2011): **MosSCI and Gateway Compatible Plasmid Toolkit for Constitutive and Inducible Expression of Transgenes in the C. elegans Germline.** (*J. Peccoud, szerk.*) *PLoS ONE.* 6, 5:. e20082. ISSN: 1932-6203

Zerial M., és McBride H. (2001): **Rab proteins as membrane organizers..** *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2, 2:. 107–17. ISSN: 1471-0072

Zevian Shannin C., és Yanowitz Judith L. (2014): **Methodological considerations for heat shock of the nematode Caenorhabditis elegans..** *Methods (San Diego, Calif.).* 68, 3:. 450–7. ISSN: 1095-9130

Zhang Qingbei, McCorkle Joseph R., Novak Marian, Yang Mengmeng és Kaetzel David M. (2011): **Metastasis suppressor function of NM23-H1 requires its 3'-5' exonuclease**

- activity..** *International journal of cancer*. 128, 1:. 40–50. ISSN: 1097-0215
- Zhijun X., Shulan Z. és Zhuo Z. (2007): **Expression and significance of the protein and mRNA of metastasis suppressor gene ME491/CD63 and integrin alpha5 in ovarian cancer tissues..** *European journal of gynaecological oncology*. 28, 3:. 179–83. ISSN: 0392-2936
- Zhou Z., Hartweg E. és Horvitz H. R. (2001): **CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in C. elegans..** *Cell*. 104, 1:. 43–56. ISSN: 0092-8674
- Zhu J., Tseng Y. H., Kantor J. D., Rhodes C. J., Zetter B. R., Moyers J. S. és Kahn C. R. (1999): **Interaction of the Ras-related protein associated with diabetes rad and the putative tumor metastasis suppressor NM23 provides a novel mechanism of GTPase regulation..** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96, 26:. 14911–8. ISSN: 0027-8424
- Ziel Joshua W., és Sherwood David R. (2010): **Roles for netrin signaling outside of axon guidance: A view from the worm.** *Developmental Dynamics*. 239, 5:. NA-NA. ISSN: 10588388
- Zijlstra Andries, Mellor Rebecca, Panzarella Giano, Aimes Ronald T., Hooper John D., Marchenko Natalia D. és Quigley James P. (2002): **A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction..** *Cancer research*. 62, 23:. 7083–92. ISSN: 0008-5472

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Farkas Zsolt

MTMT-azonosító: 10048710

A doktori értekezés címe és alcíme: **A nukleozid-difoszfát kináz NDK-1/NME1 szerepe a membránátrendezési folyamatokban: hatása a sejtmigrációra és a fagocitózisra**

DOI-azonosító46: 10.15476/ELTE.2019.196

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Klasszikus és molekuláris genetika program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Vellainé Takács Krisztina, PhD

A témavezető munkahelye: ELTE TTK, Embertani Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019.09.06.

.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet